

## 高效液相色谱-质谱联用法识别明胶动物来源

张贵锋, 刘 涛, 刘永东, 苏志国\*

(中国科学院过程工程研究所生化工程国家重点实验室, 北京 100080)

### Gelatin Differentiation by Detecting Marker Peptides in the Digested Gelatins with High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry.

ZHANG Gui-feng, LIU Tao, LIU Yong-dong, SU Zhi-guo

(National Key Lab of Biochemical Engineering, Institute of Process Engineering,  
Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

**Abstract:** Gelatins were digested with trypsin. Mass spectrometric analysis indicated that the molecular weight range of the gelatins shifted from 40,000 Da to less than 5,000 Da. The peptides in the digest mixtures were identified with high performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. It was found that the digest mixtures of bovine contained lots of typical peptides, which may act as markers for gelatin differentiation. The bovine gelatin was identified with marker peptides that corresponding bovine collagen type I. The applicability of the method was validated with mixed gelatins. The result indicated that tryptic digestion and identification of marker peptides with mass spectrometry is a feasible strategy for gelatin differentiation.

**Key words:** gelatin; tryptic digestion; marker peptides; mass spectrometry; identification

中图分类号: O657.63 文献标识码: A 文章编号: 1004-2997(2006)增刊-183-02

明胶是动物胶原蛋白经化学处理得到的多肽混合物,具有良好的水溶性,其水溶液随温度改变可在溶胶与凝胶间发生可逆转变。明胶的这种独特物理性质使其在医药、食品、化妆品、感光材料及其它领域获得广泛应用。制备明胶的主要原料是牛骨、猪骨或猪皮等,动物来源、年龄以及胶原蛋白类型等对明胶的性质均有不同程

度的影响。近年来,疯牛病的频繁发生引起了广泛关注,虽然有研究表明适当的处理工艺可使明胶不具有传染性,然而许多国家严格禁止从存在疯牛病的国家进口基于牛源的生物制品(包括明胶)。目前,利用鱼皮制备明胶以取代牛源和猪源明胶的研究逐渐升温。因此,有必要建立明胶动物来源分析的方法。

基金项目:国家自然科学基金(No. 20536050、No. 20576136)

作者简介:张贵锋(1972~),男(汉族),河北邯郸人,在职博士研究生,蛋白质药物与质谱分析方向。

E-mail: gzfzhang@home.ipe.ac.cn

\* 通讯作者:苏志国(1954~),男(汉族),辽宁沈阳人,研究员、博士生导师,蛋白质相关技术研究。E-mail: zgusu@home.ipe.ac.cn

Nemati 等人的研究表明将明胶水解成氨基酸通过主要成分分析的方法可以鉴别明胶的动物来源<sup>[1]</sup>。Hidaka 等人发现明胶可以促使磷酸钙沉淀,而使用不同动物的明胶产生的沉淀量存在很大差异,明胶的这一性质也可用于鉴别其动物来源<sup>[2]</sup>。然而这两种方法只能用于鉴别某一动物来源的明胶,而对于混合明胶则存在较大的误差。Levieux 开发的利用酶联免疫反应识别明胶动物来源的方法虽然可以鉴别混合样品<sup>[3]</sup>,但存在灵敏度低、成本高等缺点。2004 年 Ocana 的研究发现,利用盐酸将明胶部分水解,通过液质联用检测不同明胶释放的特征肽段可以有效鉴别混合明胶<sup>[4]</sup>,在检测灵敏度及检测限等方面有了很大改进,但该方法需要使用高浓度的盐酸,而且水解温度和水解时间对最终结果产生很大影响,使该方法实际应用存在一定难度。明胶是胶原蛋白的降解物,而不同动物的同类型胶原蛋白的氨基酸序列存在一定差异,因此,理论上不同动物来源的明胶中的多肽在氨基酸序列上存在一定差异。本研究目的在于开发一种利用液质联用技术识别明胶动物来源的新方法。

实验首先利用胰蛋白酶将牛明胶和猪明胶进行降解(酶:明胶=1:100(m/m),酶解温度:37℃,时间:8 h,pH 8.0),基质辅助激光解析电离飞行时间质谱分析结果表明,明胶的分子量范围在 5 000 Da~160 000 Da,而明胶经胰蛋白酶降解后形成的多肽混合物分子量在 5 000 Da 以内。利用高效液相色谱质谱联用系统对酶解后的明胶多肽进行了识别。液相色谱条件:液相系统:Agilent1100;色谱柱:Agilent Zobarx SB C18(2.1×150 mm,5 μm);流动相:A 水(0.1%TFA),B:乙腈(0.1%TFA);梯度:0~90 min,5%~50%B。质谱条件:LCQ DecaXP 质谱仪(美国热电公司);扫描范围: $m/z$  300~2 000;二级质谱;数据依赖型扫描。数据解析软件:Bioworks 3.0。结果表明,牛源明胶和猪源明胶经胰蛋白酶降解后存在许多特征肽段,特征肽段可以作为鉴别明胶动物来源的标记物。牛源明胶和猪源明胶酶解后的多肽混合物中也存在许多相同的多肽,这些多肽对于明胶的鉴别没有

意义。利用相同的方法处理平均分子量不同的明胶发现,特征肽段的含量与明胶的平均分子量密切相关。酶解后得到的特征肽段含量越高随明胶分子量升高而增加。

在哺乳动物的皮肤、软骨等结缔组织中的主要胶原蛋白是 I 型胶原蛋白,因此,理论上明胶中存在 I 型胶原蛋白降解得到的多肽,而不同类型的胶原蛋白以及不同动物来源的同一类型胶原蛋白其氨基酸序列存在很大差异,胶原蛋白的类型可以通过检测酶解后的多肽得以确认<sup>[5]</sup>,本研究是胶原蛋白类型识别方法的在明胶分析中的应用。研究表明:明胶经过酶法降解后存在特征肽,根据特征肽的种类可以确定明胶的动物来源。该研究方法已经用于阿胶的真伪鉴别,虽然驴皮胶原蛋白的序列未知,但可以根据酶法降解后的特征离子进行驴皮明胶的确认。

#### 参考文献:

- [1] M Nemati, M R Oveisi, H Abdollahi, et al. Differentiation of bovine and porcine gelatins using principal component analysis[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2004, 34: 485-492.
- [2] S Hidakaa, S Y Liu. Effects of gelatins on calcium phosphate precipitation: a possible application for distinguishing bovine bone gelatin from porcine skin gelatin[J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2003,16: 477-483.
- [3] A Venien, D Levieux. Differentiation of bovine from porcine gelatins using polyclonal anti-peptide antibodies in indirect and competitive indirect ELISA[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2005,39: 418-424.
- [4] M F Ocana, H Neubert, A Przyborowska, et al. BSE Control: Detection of gelatine-derived peptides in animal feed by mass spectrometry[J]. *Analyst*, 2004, 129: 111-115.
- [5] G F Zhang, A M Sun, W J Li, et al. Mass spectrometric analysis of enzymatic digestion of denatured collagen for identification of collagen type [J]. *Journal of Chromatography A*, 2006,1114: 274-277.