

在常规分析中使用ProteinWorks™ Auto-eXpress快速酶解试剂盒和Xevo™ TQ-XS鉴别明胶来源物种的完整解决方案

Yin Ling Chew, Jun Xiang Lee

Waters Corporation

摘要

不同动物来源的明胶是多种食品、药品和化妆品中的常见成分。出于健康和宗教原因，鉴别明胶来源物种的重要性日益增加。例如，使用最广泛的猪明胶是一种非清真成分，受到伊斯兰教的严格禁止。在本研究中，我们开发了一套鉴别明胶来源物种的完整解决方案，包括简单快速的样品前处理和适用于常规分析的稳定LC-MS/MS方法。该工作流程包括使用ProteinWorks Auto-eXpress快速酶解试剂盒的样品前处理方法。这是一款即用型试剂盒，可在三小时内完成样品酶解方案，从而实现在一天内完成样品前处理、进样至仪器并获得结果。使用ACQUITY™ Premier色谱柱分离肽段标记，将ACQUITY UPLC™ I-Class与Xevo TQ-XS串联质谱仪联用以尽可能提高灵敏度。

优势

- 使用ProteinWorks Auto-eXpress快速酶解试剂盒，在三小时内简单快速地通过三步方案完成样品前处理
 - 只需一种液质联用(LCMS)方法即可检测含明胶食品样品中的多种来源物种
 - 每个肽段标记使用多个MRM通道，以提高物种鉴别的可靠性
-

简介

明胶是从动物的皮毛、皮肤和骨骼中提取的胶原蛋白经过部分水解获得的多肽混合物¹，因具有凝胶特性和低成本而广泛应用于食品、药品和化妆品中^{1,2}。商业明胶的主要来源是牛和猪明胶，但除此之外也有鱼类和家禽等其他新的明胶来源³。

由于健康和宗教等各种原因，产品中明胶的来源已成为一个主要关注的问题。例如，含有猪衍生生物的产品属于非清真食品，在伊斯兰教中受到禁止⁴。因此，鉴别明胶来源物种对于确保伊斯兰社区使用的产品符合各自国家/地区的清真法规非常重要。

最近，LCMS方法因所具有的灵敏度和选择性而越来越多地应用于明胶鉴别中⁵。该技术通常通过检测明胶样品的胰蛋白酶酶解物来确定其中是否含有物种特异性肽段标记。如果实施得当，该技术可以在一次分析中同时检测多个物种。然而，该技术面临的挑战之一是样品前处理步骤中胰蛋白酶过夜酶解的时间较长。使用ProteinWorks Auto-eXpress快速酶解试剂盒时，RapiGest™ SF表面活性剂提高了胰蛋白酶酶解的速度和完整性，因此样品前处理方案可显著缩短至三个小时。这大幅提高了生产力，使实验室分析人员能够在一天内获得实验结果。

在之前的研究中，我们已经证实蛋白质组学发现工作流程可以鉴定牛和猪明胶的物种特异性肽段标记⁶。本应用纪要是该项研究的续篇，将展示我们开发出的一种稳定的LC-MS/MS方法，用于对明胶食品样品中的牛和猪物种特异性肽段标记进行常规分析。

实验

用50 mM碳酸氢铵(NH₄HCO₃)预处理两种市售的纯正牛和猪明胶参考标准品(Sigma Aldrich)和八个糖果样品。随后执行ProteinWorks Auto-eXpress Low 3快速酶解试剂盒(P/N: [176004077](https://www.waters.com/nextgen/global/shop/application-kits/176004077-proteinworks-auto-express-low-3-digest-kit.html) <
<https://www.waters.com/nextgen/global/shop/application-kits/176004077-proteinworks-auto-express-low-3-digest-kit.html>>)的三步方案，如图1所示。

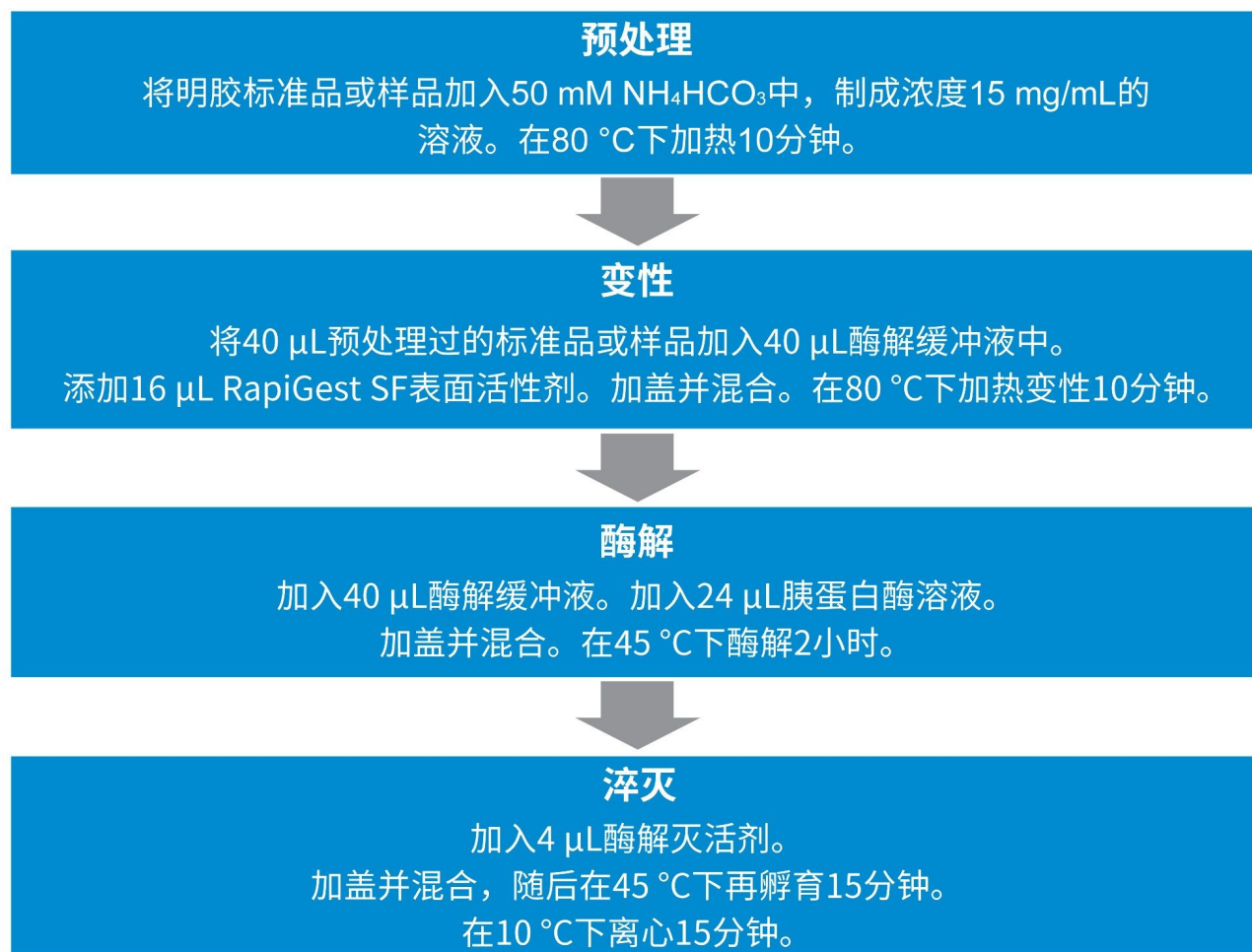


图1.使用ProteinWorks Auto-eXpress快速酶解试剂盒的三步酶解方案

液相色谱条件

液相色谱系统:	ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统
色谱柱:	ACQUITY Premier UPLC HSS T3色谱柱, 1.8 μm, 2.1 mm x 100 mm (P/N: 186009468)
柱温:	40 °C

进样体积： 2 μ L

流速： 0.40 mL/min

流动相A： 0.1%甲酸的水溶液

流动相B： 0.1%甲酸的乙腈溶液

梯度表

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
初始	0.4	95	5	初始
0.5	0.4	95	5	6
12	0.4	75	25	6
12.1	0.4	25	75	6
14	0.4	25	75	6
14.1	0.4	95	5	6
16.5	0.4	95	5	6

质谱条件

质谱系统： Xevo TQ-XS

电离模式： ESI (+)

毛细管电压： 1 kV

离子源温度： 130 °C

脱溶剂气温度： 600 °C

锥孔气流速:	150 L/h
脱溶剂气流速:	1000 L/h
喷雾器气流速:	7.0 bar

数据管理

色谱软件:	MassLynx™ v4.2
质谱软件:	MassLynx v4.2
信息学软件:	TargetLynx™ v4.2

MRM通道

使用MRM通道模式收集数据。为每个肽段标记选择了4-5个MRM通道，如下表1所示。

物种	序列	MRM
牛	GATGPAGVR	393.2>402.2
		393.2>499.3
		393.2>556.3
		393.2>657.4
	GETGPAGPAGPIGPVGAR	780.91>570.3
		780.91>823.48
		780.91>766.5
		780.91>991.6
	IGQPGAVGPAGIR	596.8>513.3
		596.8>894.5
		596.8>669.4
		596.8>740.4
		596.8>797.5
	QGPSGASGER	473.22>576.3
		473.22>519.3
		473.22>498.2
		473.22>585.3
		473.22>760.4
	SGDRGETGPAGPAGPIGPVGAR	659.34>766.5
		659.34>823.5
	659.34>985.4	
	659.34>991.6	
猪	GETGPAGPAGPVGPVGAR	773.9>499.3
		773.9>809.5
		773.9>752.4
		773.9>991.5
	GlpGEFGLpGPAGPR	727.4>642.3
		727.4>837.5
		727.4>780.4
		727.4>984.5
		727.4>1283.6
	SGDRGETGPAGPAGPVGPVGAR	654.7>809.5
		654.7>752.4
		654.7>880.5
		654.7>977.6
		654.7>985.4
	TGQPGAVGPAGIR	590.82>570.3
		590.82>513.3
		590.82>669.4
		590.82>894.5
		590.82>797.5

表1.九个牛和猪物种特异性肽段标记的MRM通道

结果与讨论

这种样品前处理方法的主要优点是可以在三个小时内完成从样品预处理到淬灭步骤的整个过程。RapiGest SF是一种阴离子表面活性剂，在变性步骤中具有MS兼容性，有助于加快胰蛋白酶酶解的速度。与其他需要过夜酶解的方案不同，此方法可以在同一天进行样品前处理、进样和数据处理，是快速分析和常规分析的理想选择。

我们基于之前的发现工作⁶开展了进一步研究并确立了一种LCMS分析方法。共选择9个肽段标记；5个牛肽段标记和4个猪肽段标记，对每个肽段标记选择了4~5个MRM通道作为确认离子，以提高检测方法的稳定性和可靠性。

对于待检肽段，至少三个MRM通道的信噪比不得低于3，同时必须确定至少两种肽段标记用于物种归属⁷。

我们使用确立的方法分析了8种市售含明胶糖果样品，结果列于表2。

样品	清真声明	检测到的肽段标记数量	
		牛	猪
糖果1	是	5	未检出
糖果2	是	5	未检出
糖果3	是	5	未检出
糖果4	是	5	未检出
糖果5	否	未检出	4
糖果6	否	5	4
糖果7	否	5	4
糖果8	否	4	4

表2. 八种市售糖果样品的筛查结果

其中一个样品（糖果1）的产品标签上标明该产品已取得清真认证。如图2所示，在样品中未检测到猪肽段标记，因此通过LCMSMS分析获得的色谱图符合产品标签信息。另一个样品（糖果5）是一种非清真产品，所用的明胶为猪明胶。糖果5的色谱图（图3）显示共检测到四个猪肽段标记，符合产品标签信息。

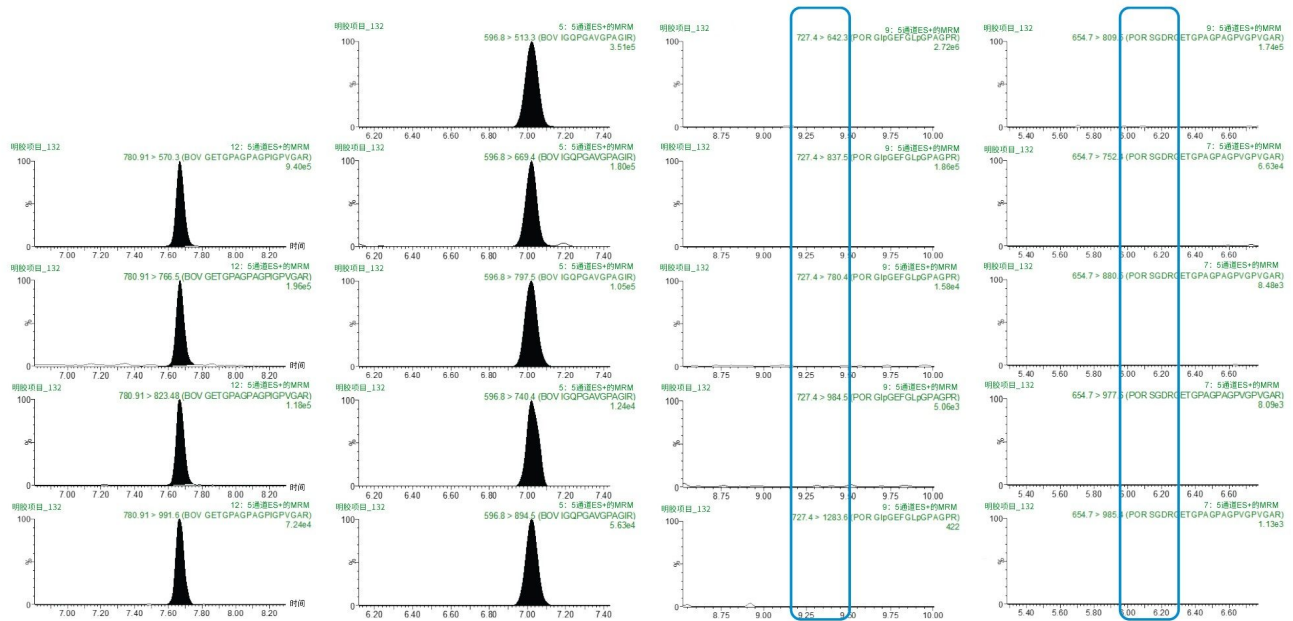


图2.样品糖果1（清真标记）的色谱图。显示的MRM通道为

(a)两个牛肽段标记（*GETGPAGPAGPIGPVGAR*和*IGQPGAVGPAGIR*）和

(b)两个猪肽段标记(*GlpGEFGLpGPAGPR*和*SDDRGETGPAGPAGVGPVGAR*)。两个猪肽段标记（未显示）的预期保留时间用浅蓝色框突出显示。

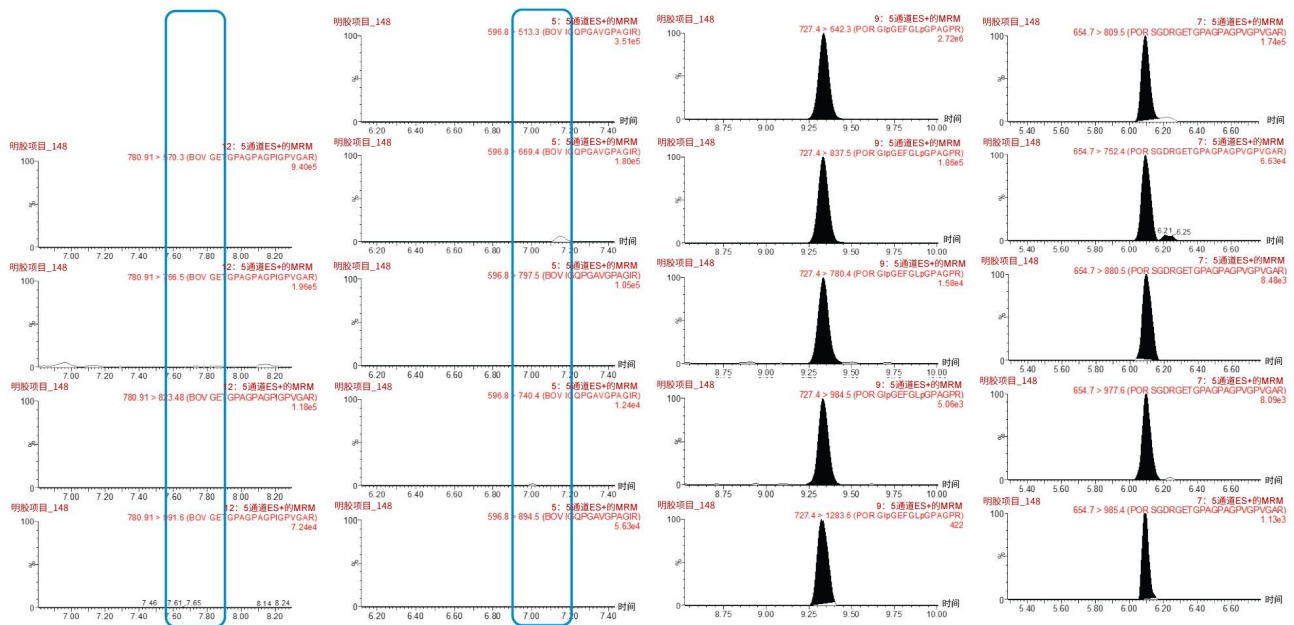


图3.样品糖果5（无清真标记）的色谱图。显示的MRM通道为

(a)两个牛肽段标记（*GETGPAGPAGPIGPVGAR*和*IGQPGAVGPAGIR*）和

(b)两个猪肽段标记(*GlpGEFGLpGPAGPR*和*SGRDRGETGPAGPAGVGPVGAR*)。两个牛肽段标记（未显示）的预期保留时间用浅蓝色框突出显示。

将猪明胶标准品加入牛明胶标准品中以模拟猪明胶掺假行为。图4显示了加入和未加入1%猪明胶的牛明胶的色谱图。从图中可以明显看出，在Xevo TQ-XS上使用确立的方法可以轻松检测到该含量水平的猪肽段标记。

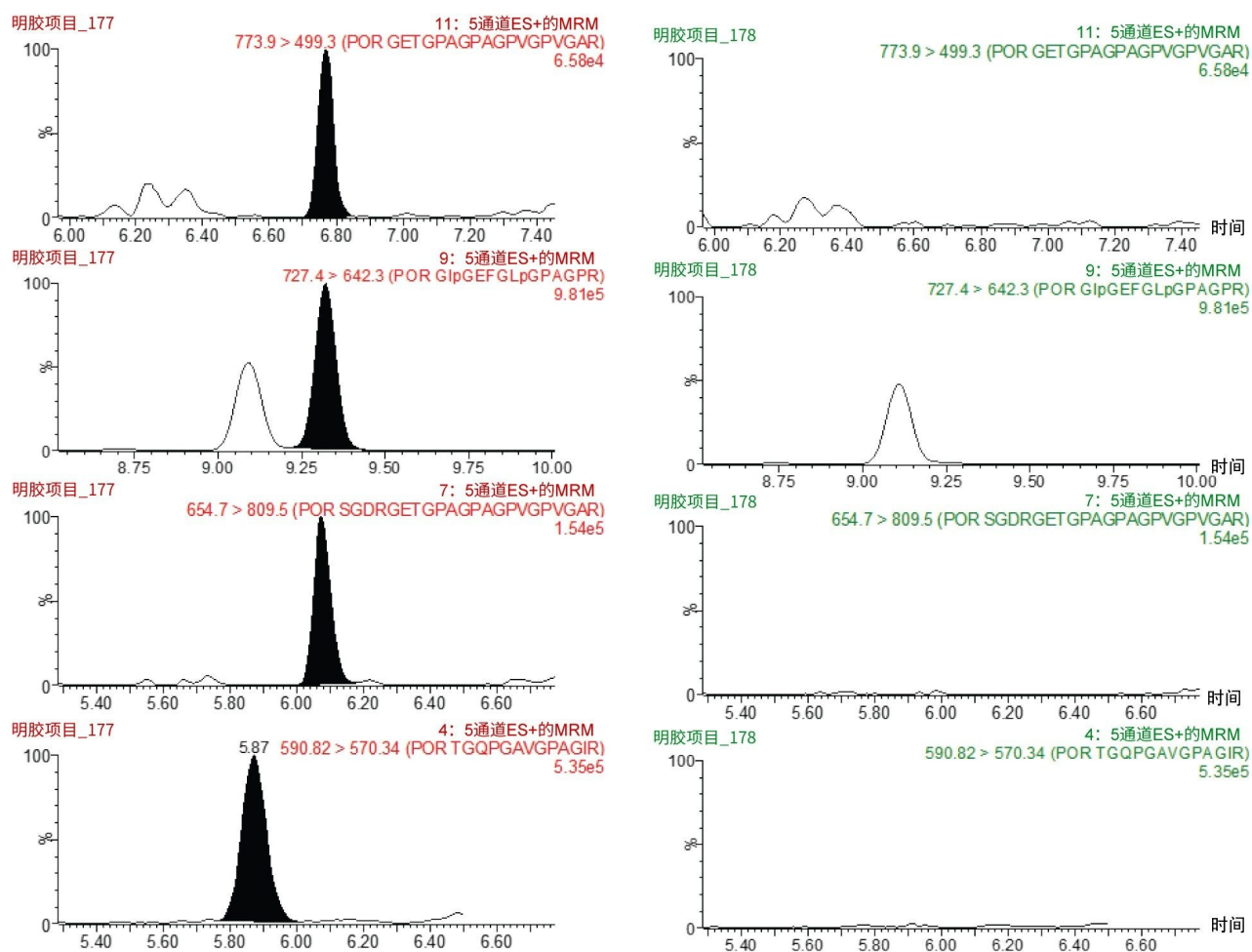


图4.四个猪肽段标记的色谱图：

(a)掺入1%猪明胶的牛明胶和

(b)纯牛明胶。

结论

本研究介绍了一套使用LC-MS/MS鉴别明胶来源物种从样品前处理到肽段标记分离的完整解决方案，该解决方案适用于糖果等含明胶食品的常规分析。该方法能够检测出掺假率低至1%的明胶来源物种（牛或猪）。

ProteinWorks Auto-eXpress快速酶解试剂盒可在3小时内完成简单快速的酶解方案。这种基于试剂盒的方法还确

保了在常规测试环境中进行方法转移的简便性。

参考资料

1. Guo S, Xu X, Zhou X and Huang Y. A rapid and simple UPLC-MS/MS method using collagen marker peptides for identification of porcine gelatin. *RSC Adv.* (2018), 8: 3768–3773.
2. Shabani H, Mehdizadeh M, Mousavi S M, Dezfouli E A, Solgi T, Khodaverdi M, Rabiei M, Rastegar H and Alebouyeh M. Halal authenticity of gelatin using species-specific PCR. *Food Chem.* (2015), 184: 203-206.
3. Uddin SMK et al. Halal and Kosher Gelatin: Applications as Well as Detection Approaches with Challenges and Prospects. *Food Bioscience* (2021) 41:101422.
4. Nhari R M H R, Ismail A, and Man Y B C. Analytical Methods for Gelatin Differentiation from Bovine and Porcine Origins and Food Products. *J. Food Sci.* (2012), 71(1): R42–46.
5. Deng G *et al.* Recent Advances in Animal Origin Identification of Gelatin-Based Products Using Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Methods: A mini review. *Reviews in Analytical Chemistry* (2020) 39:260–271.
6. Chantel Lee, Li Yan Chan, A Complete Discovery Workflow for Species-Specific Gelatin Identification, Waters Application Note, [720007533](https://www.waters.com/720007533), 2022.
7. Song E, Gao Y, Wu C, Shi T, Nie S, Fillmore T L, Schepmoes A A, Gritsenko M A, Qian W, Smith R D, Rodland K D, Liu T. Targeted Proteomic Assays For Quantitation of Proteins Identified by Proteogenomic Analysis of Ovarian Cancer. *Sci.Data* (2017), 1–13.

特色产品

ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统 <<https://www.waters.com/134613317>>

Xevo TQ-XS三重四极杆质谱仪 <<https://www.waters.com/134889751>>

[MassLynx MS软件 <https://www.waters.com/513662>](https://www.waters.com/513662)

[TargetLynx <https://www.waters.com/513791>](https://www.waters.com/513791)

720007667ZH, 2022年7月

© 2022 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [网站地图](#) [招聘](#) [Cookie](#) [Cookie](#) [设置](#)

沪 ICP 备06003546号-2

京公网安备 31011502007476号