

基于生物质谱的胶原蛋白定量检测方法

孙坤¹, 杨帆¹, 孔英俊², 康跻耀², 曹玮¹, 杨小雁¹, 查圣华², 张贵锋², 王明林¹

1 山东农业大学 食品科学与工程学院, 山东 泰安 271018

2 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 100190

孙坤, 杨帆, 孔英俊, 等. 基于生物质谱的胶原蛋白定量检测方法. 生物工程学报, 2015, 31(11): 1660–1668.

Sun K, Yang F, Kong YJ, et al. Collagen quantitation by detection of marker peptides with HPLC-MS. Chin J Biotech, 2015, 31(11): 1660–1668.

摘要: 本研究旨在建立一种基于特征多肽的胶原定量检测方法, 通过序列比对的方法筛选胶原蛋白特征多肽, 利用胰蛋白酶将牛 I 型胶原蛋白标准品进行酶解, 采用液质联用技术 (HPLC-MS) 对特征多肽进行检测, 建立特征多肽丰度与胶原蛋白浓度对应关系并用于实际样品分析。结果表明, 牛 I 型胶原蛋白中检测出 6 种特征多肽, 其中多肽 GEAGPSGPAGPTGAR 由于其丰度高且二级质谱稳定适合作为定量检测的特征多肽, 多肽信号强度与蛋白浓度 (0.1–3.0 mg/mL) 呈良好线性关系。将所建方法用于实际样品分析, 牛跟腱胶原蛋白含量为 90.2%, 胶原海绵中胶原蛋白含量为 93.4%, 检测结果与基于氨基酸组成分析的结果一致。该研究表明基于 HPLC-MS 的特征多肽分析方法进行胶原蛋白定量检测具有可行性, 该方法在含胶原蛋白医疗器械等生物制品质量控制方面具有应用前景。

关键词: 胶原蛋白, 定量检测, 特征多肽, 液相色谱串联质谱

Received: January 14, 2015; **Accepted:** April 23, 2015

Supported by: National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2014AA022109).

Corresponding authors: Minglin Wang. Tel: +86-538-8249241; E-mail: mlwang@sdau.edu.cn

Guifeng Zhang. Tel: +86-10-82613421; E-mail: gfzhang@ipe.ac.cn

国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2014AA022109) 资助。

Collagen quantitation by detection of marker peptides with HPLC-MS

Kun Sun¹, Fan Yang¹, Yingjun Kong², Jiyao Kang², Wei Cao¹, Xiaoyan Yang¹, Shenghua Zha², Guifeng Zhang², and Minglin Wang¹

¹ College of Food Science and Engineering, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, Shandong, China

² State Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China

Abstract: A method for quantitation of collagen was established by detecting marker peptide with high performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS). Theoretical marker peptides were selected by sequence comparison. Bovine collagen type I was digested with trypsin. Marker peptides typical for collagen type I were identified with HPLC-MS. The relationship between the abundance of marker peptides and collagen concentration was established. The results show that GEAGPSGPAGPTGAR and the other 5 peptides showed high resolution during chromatographic separation and high signal intensity during MS analysis. Peptide signal intensity and collagen concentration showed a good linear relationship in the range from 0.1 to 3 mg/mL. Bovine tendon and collagen sponge were used as actual samples and collagen contents were determined as 90.2% and 93.4% respectively. Quantitation of marker peptides of collagen was a feasible method to identify and quantify collagens in medical device research and development.

Keywords: collagen, quantitative detection, marker peptides, HPLC-MS

胶原蛋白是哺乳动物体内含量最丰富的蛋白质, 约占总蛋白的 25%–30%^[1-2]。胶原作为细胞外基质的主要成分, 广泛存在于骨、腱、软骨、皮肤等组织^[3]。胶原蛋白具有良好的生物相容性、弱免疫原性和生物可降解性。近年来随着生物医药和生物技术的飞速发展, 胶原蛋白在医疗器械、组织工程和再生医学等领域应用广泛^[4-6]。因此, 建立有效的定量检测方法不仅有助于含胶原的生物制品质量控制, 而且为深入研究胶原相关疾病提供基础支持。胶原蛋白由 3 条 α 肽链以平行、右旋的形式缠绕而成, 这种特殊的结构使其难以提取和定量分析^[7-8]。传统的干重法通过对原材料进行处理将胶原蛋白提取分离出来, 干燥得到冻干胶原蛋白后测干重分数^[9-10], 过程繁琐且灵敏度低。对于可溶

性胶原蛋白, Pilar 等^[11]使用天狼猩红染料检测胶原蛋白分子含量, 该方法不适用于组织分析。目前应用最广泛的方法是羟脯氨酸 (HYP) 法, 其依据于胶原蛋白水解为游离氨基酸进而测量胶原蛋白中特有的 HYP, 利用 HPLC 或光度法测定其含量以计算胶原蛋白的含量^[12-14], 但其水解和衍生过程繁琐且 HYP 含量随生长期不断变化, 不是所有来源的胶原都有确定的转换系数。基于 ELISA 的检测方法是将胶原作为抗原与抗体结合再与辣根过氧化物酶 (Horse radish peroxidase, HRP) 或碱性磷酸酶 (Alkaline phosphatase, AKP) 酶偶联的抗体结合, 经化学显色反应, 检测显色底物的吸光度值即可确定胶原的相对含量^[15], 但其每一步都需洗涤, 过程较长并不适于组织标本。基于质谱的胶原蛋

白定量方法是利用酶法将胶原蛋白酶解成多肽片段, Gly-Pro-Hyp 作为胶原蛋白特异性肽段, 用基质辅助激光解吸飞行时间质谱 (MALDI-TOF) 通过 Arg-Gly-Asp 和 Gly-Pro-Hyp 对胶原蛋白进行定量, 方法简单便捷且灵敏度高, 但不能进行胶原蛋白类型识别^[16]。崔琳等^[17]利用稀酸溶解和酶法提取了大鼠皮肤中的总胶原蛋白, 将胶原蛋白粗提品变性后用胰蛋白酶进行降解, HPLC-MS 法分析胶原蛋白的特征多肽, 并研究不同生长期大鼠皮肤中 I 型和 III 型胶原蛋白相对含量, 这种方法对于分析组织中胶原蛋白类型及动态变化具有可行性, 为临床应用提供基础, 但涉及繁琐的胶原蛋白提取过程。所有方法都存在样品处理过程复杂、精密度灵敏度低及应用范围窄等缺点。

本研究针对现有胶原蛋白定量检测方法的不足, 旨在建立一种快速有效的利用 HPLC-MS 基于特征多肽的胶原蛋白类型识别及定量检测方法。实验以牛 I 型胶原蛋白为研究对象, 采用热变性的方法将其变性, 用胰蛋白酶进行酶切, 利用 HPLC-MS 技术筛选特异性肽段, 通过得到特征多肽含量与牛 I 型胶原蛋白浓度的线性关系用于牛 I 型胶原蛋白及胶原海绵等的定量检测。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

新鲜的牛跟腱购于超市; 牛 I 型胶原蛋白标准品为 Sigma 公司产品; 胶原海绵为无锡贝迪公司产品; 胰蛋白酶为 Promega 公司产品; 色谱纯乙腈和三氟乙酸 (TFA) 为 Merck 公司产品; 其他试剂均为市售分析纯。

1.2 仪器和设备

高效液相色谱 (美国安捷伦公司, Agilent 1100), 电喷雾离子阱质谱 (美国热电公司, 型号 LCQ Deca^{XP}), 质谱数据采集软件 (美国热电公司, Xcalibur 1.3) 和数据分析软件 (美国热电公司, Bioworks 3.1)。

1.3 方 法

1.3.1 牛 I 型胶原蛋白标准品储备液

精确称取牛 I 型胶原蛋白标准品适量, 加微量 pH 2.0 稀盐酸溶液, 加水配制成浓度分别为 0.1、0.5、1、2、3 mg/mL 标准品溶液作为储备液, 待用。

1.3.2 牛跟腱样品

精确称取新鲜牛跟腱 (含水率 64%), 剪碎后匀浆, 加微量 pH 2.0 稀盐酸溶液, 加水配制成牛跟腱样品溶液。

1.3.3 实际样品 (胶原海绵)

精确称取实际样品适量, 加微量 pH 2.0 稀盐酸溶液, 加水配制成实际样品溶液。

1.3.4 胶原蛋白变性与酶法降解

取牛 I 型胶原蛋白标准品储备液置于 60 °C 水浴中恒温加热 3 h 后, 15 000 r/min 离心 10 min 收集上清液, 待降至室温后加入 NH₄HCO₃ 固体调至 pH 8.0 左右, 加入胰蛋白酶 (酶: 胶原蛋白=1:50 (W/W)), 37 °C 酶解 20 h 使胶原蛋白酶解完全^[18]。牛跟腱样品及实际样品按同样方法进行变性及酶解处理。将酶解处理后的上清液进行液相色谱质谱联用分析。

1.3.5 氨基酸组成分析

按照参考文献^[19]的方法。

1.3.6 HPLC-MS 分析

多肽筛选高效液相色谱条件: 色谱柱:

Zobarx SB C18 (150 mm×2.1 mm I.D., 5 μm); 流动相 A: 水 (含 0.1%三氟乙酸), B: 乙腈 (含 0.1%三氟乙酸); 梯度: 0–70 min, 5%–40% B, 70–80 min, 40%–90% B, 80–90 min, 90%–90% B; 流速: 0.2 mL/min; 柱温: 30 °C; 多肽筛选质谱条件: ESI 电喷雾离子源, 喷雾电压 4.5 kV, 加热电压 15 V, 离子导入电压 (Skimmer 电压) –20 V, 鞘气流速: 19.8 mL/min, 辅助气流速: 5 psi, 离子传输毛细管温度: 300 °C。当筛选特征多肽时离子的监测模式参数中设立 3 个 Scan event, Scan event 1 为一级质谱全扫描, 扫描范围为 m/z 300–2 000, 正离子监测, Scan event 2 和 3 为数据依赖型精确质量数扫描和二级质谱的扫描均采用全扫描模式。

2 结果与讨论

2.1 牛 I 型胶原蛋白特征多肽筛选

牛跟腱中胶原蛋白主要是 I 型, 胶原蛋白经胰蛋白酶处理后产生大量低分子量的多肽, 符合定量检测的多肽应满足以下条件: 1) 特异性: 对牛 I 型 II 型多肽进行 Blast 多序列比对, 只在牛 I 型胶原蛋白序列中被检出的肽段为牛 I 型胶原的特征多肽, 同样的方法可得 I 型 $\alpha 1$ (I) 链和 $\alpha 2$ (I) 链的特征多肽。2) 肽段信息为阳性结果: 酶解后的多肽质谱信息用 SEQUEST 软件进行数据库搜索, 当搜索结果用如下参数进行过滤时, 所产生的肽段被认为是阳性结果, 即当多肽带 1 个电荷时, $Xcorr > 1.5$, 2 个电荷时, $Xcorr > 2.0$, 3 个电荷时, $Xcorr > 2.5$, 同时, $Cn > 0.1^{[20]}$ 。3) 肽段短小: 分子量超过 2 000 Da 的多肽由于二级质谱产生的碎片离子过多导致数据库检索结果中多肽识别准确率低, 降低了方法的有效性, 所以选择较短小的

肽段。4) 羟基化修饰位点较少: 胶原蛋白中许多脯氨酸在表达后发生羟基化修饰, 一般肽段序列若含有 G-X-Y 结构, Y 为脯氨酸时发生羟基化修饰, 使用特征多肽进行定量时, 需定义翻译后修饰, 即需要将脯氨酸的质量数增加 16, 羟基化修饰位点越多搜索的质量数越多, 数据越多越复杂不利于定量。5) 最低检测限可被检出且多肽丰度高: 在液质联用分析质谱图中提取特征多肽的离子流图, 在低浓度样品质谱图中可提取到且峰面积含量高即适合作为特征多肽。按以上条件筛选得到特征多肽候选肽段。

胰蛋白酶酶解后的牛跟腱用 HPLC-MS 方法对其进行全扫描分析。酶解后的多肽段进行 Blast 多序列比对, 结果表明 I 型胶原的 $\alpha 1$ (I) 链和 $\alpha 2$ (I) 链存在一定数量的特征多肽。以全部牛 I 型胶原蛋白为数据库, 将牛跟腱胶原蛋白降解后的多肽质谱信息用 SEQUEST 软件进行数据库搜索, 筛选具有阳性结果的多肽段, $\alpha 1$ (I) 链筛选出 6 个 (表 1) 特征多肽候选多肽段。

肽段 P3 和 P6 的丰度较低。P1 和 P5 的肽段虽然丰度较高但其肽段序列过长, 发生羟基化修饰且羟基化修饰位点很多不利于定量。P2 肽段丰度高且不发生羟基化修饰, 二级质谱匹配度低。对肽段 P4 用 HPLC-MS 再次进行分析, m/z 1281.6 是单电荷离子, m/z 641.3 是其双电荷离子, 与带单电荷离子相比, 离子 m/z 641.3 的二级质谱图中的碎片离子信号强度较高, 双电荷离子可以将更多的电荷传递给在碰撞过程中产生的碎片, 更易被检测出。定量检测采用的高效液相色谱条件为: 色谱柱: Zobarx SB C18 (150 mm×2.1 mm I.D., 5 μm); 流动相 A: 水 (含 0.1%三氟乙酸), B: 乙腈 (含 0.1%三氟乙酸); 梯度: 0–30 min, 5%–40% B; 流速: 0.2 mL/min;

表 1 所选特征多肽候选多肽段信息

Table 1 Selected candidate characteristic polypeptides information

No.	Polypeptide segments	MH+	Z	XC	DeltaCn	Peak area ($\times 10^8$)
P1	GPP*GPMGP*PGLAGPPGESGR	1 818.01	2	4.504	0.124	64
P2	GETGPAGPAGPIGPVGAR	1 561.72	2	3.987	0.924	98
P3	P*GEVGP*PPGP*PGP*AGEK	1 491.59	2	3.365	0.117	26
P4	GEAGPSGPAGPTGAR	1 281.62	2	3.346	0.897	35
P5	GFSGLQ*GPP*GP*PGSP*GEQGPSGASGPAGPR	2 706.82	2	3.274	0.260	77
P6	GQAGVMGF*GPK	1 162.35	2	3.269	1.000	21

*hydroxylated modified position.

柱温: 30 °C; 定量检测质谱条件: ESI 电喷雾离子源, 喷雾电压 4.5 kV, 加热电压 15 V, 离子导入电压 (Skimmer 电压) -20 V, 鞘气流速: 19.8 mL/min, 辅助气流速: 5 psi, 离子传输毛细管温度: 300 °C。离子的监测模式采用正离子监测模式, 一级质谱选择离子监测, 监测目标离子设为 641.3, 扫描宽度设为 1.5, 二级质谱全扫描。所得提取离子流图和一级质谱图 (图 1) 及二级质谱图 (图 2) 显示, P4 肽段 GEAGPSGPAGPTGAR 肽链短小, 不发生羟基化修饰, 结果显示在较低检测限被检出且丰度较高, 可用作特征肽段, 综上分析选择多肽 P4 作特征多肽, 用于牛 I 型胶原蛋白的类型识别及定量研究。

2.2 牛 I 型胶原蛋白浓度与多肽信号强度关系

取不同浓度经变性酶解处理后的牛 I 型胶原蛋白标准品溶液, 从低浓度到高浓度依次进样 10 μ L, 按定量检测 HPLC-MS 条件进行分析, 获得不同浓度牛 I 型胶原特征多肽 GEAGPSGPAGPTGAR 提取离子流图 (图 3)。以所选特征多肽提取离子流图峰面积为纵坐

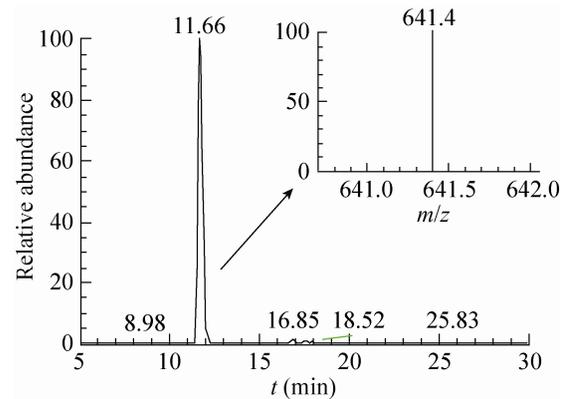


图 1 特征多肽 GEAGPSGPAGPTGAR 提取离子流图和一级质谱图

Fig. 1 The extracted ion chromatogram and mass spectrum of marker peptide GEAGPSGPAGPTGAR.

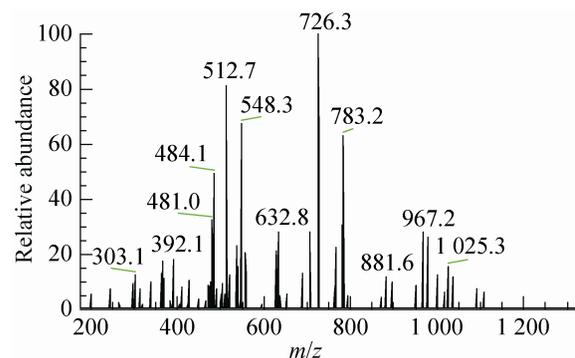


图 2 特征多肽 GEAGPSGPAGPTGAR 二级质谱图

Fig. 2 The MS/MS spectrum of marker peptide GEAGPSGPAGPTGAR.

标, 牛 I 型胶原蛋白标准品浓度 (g/L) 为横坐标, 进行线性回归。回归方程及线性范围 (图 4) 为 $y=36.231x+0.8955$ ($R^2=0.9926$), 在 0.1–3 g/L 范围内线性良好。

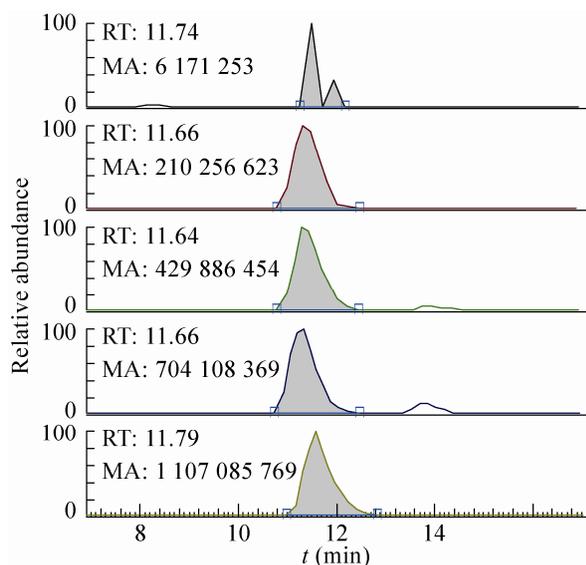


图 3 牛 I 型胶原蛋白特征多肽 GEAGPSGPAGPTGAR 提取离子流图 (从上至下浓度依次为 0.1、0.5、1、2、3 g/L)

Fig. 3 The extracted ion chromatogram of marker peptide GEAGPSGPAGPTGAR. The concentration was 0.1, 0.5, 1, 2, 3 g/L from top to bottom.

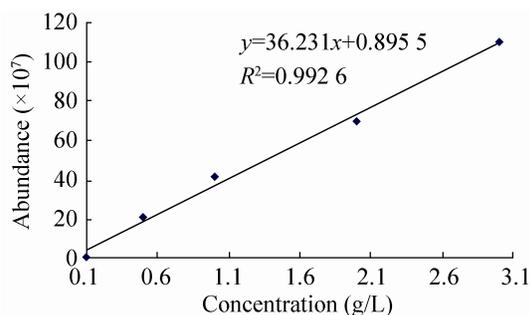


图 4 牛 I 型胶原蛋白标准品浓度与特征多肽信号强度关系曲线

Fig. 4 The curve of bovine type I standard collagen concentration and marker peptide signal intensity.

2.3 牛 I 型胶原蛋白定量检测方法的精密度和重现性

精确称取牛 I 型标准品 0.5 g/L 溶液 10 μ l, 按定量 HPLC-MS 条件进行分析, 重复进样 5 次, 结果牛 I 型标准品中特征多肽 GEAGPSGPAGPTGAR 峰面积的相对标准偏差 (RSD) 为 2.68%, 结果表明方法精密度良好。精确称取同一批牛跟腱样品 5 份, 按 1.3.2 所述方法制备样品溶液并进行 HPLC-MS 分析, 牛跟腱样品中 I 型特征多肽 GEAGPSGPAGPTGAR 峰面积的 RSD 为 3.89%, 结果表明该方法重现性良好。向牛跟腱制备的样品溶液添加了胶原蛋白标准品, 按照相同的方法进行酶解, 质谱分析结果表明, 添加胶原蛋白的回收率为 97.8%。

2.4 实际样品分析

2.4.1 牛跟腱样品 I 型胶原蛋白定量

称取 24 mg 含水率为 64% 的新鲜牛跟腱溶于 12 mL 水中, 经变性酶解处理后, 取 10 μ l 按上述 HPLC-MS 条件进行分析, 获得牛跟腱中特征多肽 GEAGPSGPAGPTGAR 提取离子流图 (图 5)。积分峰面积后代入回归方程, 计算得牛跟腱中牛 I 型胶原蛋白含量为 90.2%。基于氨基酸组成分析方法测得的牛跟腱中 HYP 的含量为 8.92%, HYP 转换为胶原蛋白的系数按 10% 计, 即牛跟腱中胶原蛋白含量为 89.2%。与氨基酸组成分析测得的胶原蛋白含量相比, 结果较为一致。

2.4.2 胶原海绵 I 型胶原蛋白定量

称取 24 mg 含水率为 2% 的胶原海绵溶于 12 mL 水中, 经变性酶解处理后, 取 10 μ l 按上述 HPLC-MS 条件进行分析, 获得胶原海绵中特

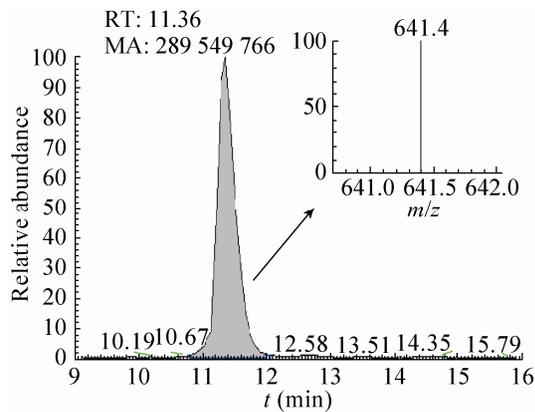


图 5 牛跟腱样品特征多肽 GEAGPSGPA GPTGAR 提取离子流图和一级质谱图

Fig. 5 The extracted ion chromatogram and mass spectrum of characteristic polypeptides GEAGPSGPA GPTGAR in bovine tendon samples.

征多肽 GEAGPSGPA GPTGAR 提取离子流图 (图 6)。测定结果表明胶原海绵中 I 型胶原蛋白含量为 93.4%。胶原海绵中胶原蛋白的含量为每 1 000 氨基酸中 HYP 为 125 个, 胶原蛋白中 Hyp 的质量分数 9.3%, HYP 转换为胶原蛋白的系数按 10% 计, 即胶原海绵中胶原蛋白含量为 93.0%, 与氨基酸组成分析测得的胶原蛋白含量相比, 结果较为一致。

3 结论

生物质谱在研究蛋白质序列、性质、定性定量等方面应用广泛^[21-22]。本研究结果表明胶原蛋白酶解产物中含有特征多肽并可作为定量的依据, 据此建立利用液相色谱质谱联用技术的胶原蛋白定量方法, 得到特征多肽含量和胶原蛋白标准品浓度的线性曲线, 方法在一定浓度范围内精密性、重现性良好 (RSD=2.68%, RSD=3.89%)。进而研究牛跟腱中胶原蛋白含量, 根据本方法测得胶原蛋白含量为 90.2% 及胶原海绵中胶原

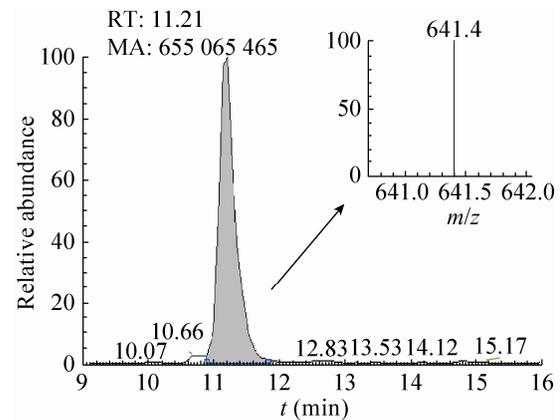


图 6 胶原海绵样品特征多肽 GEAGPSGPA GPTGAR 提取离子流图和一级质谱图

Fig. 6 The extracted ion chromatogram and mass spectrum of characteristic polypeptides GEAGPSGPA GPTGAR in collagen sponge samples.

蛋白含量为 93.4%, 均与基于氨基酸组成分析方法测得的结果一致, 表明该检测方法具有可行性, 在含胶原蛋白的医疗器械质量控制方面以及组织工程和再生医学等研究领域有一定参考价值。

REFERENCES

- [1] Bama P, Vijayalakshimi M, Jayasimman R, et al. Extraction of collagen from cat fish (*Tachysurus maculatus*) by pepsin digestion and preparation and characterization of collagen chitosan sheet. *J Pharm Pharm Sci*, 2010, 2(4): 133-137.
- [2] Liu H, Li D, Guo S. Studies on collagen from the skin of channel cat fish (*Ictalurus punctatus*). *Food Chem*, 2007, 101(2): 621-625.
- [3] Quereshi S, Mhaske A, Raut D, et al. Extraction and partial characterization of collagen from different animal skins. *Res Sci Technol*, 2010, 2(9): 28-31.
- [4] Parenteau-Bareil R, Gauvin R, Berthod F. Collagen-based biomaterials for tissue engineering

- applications. *Materials*, 2010, 3(3): 1863–1887.
- [5] Schweizer S, Bick A, Subramanian L, et al. Influences on the stability of collagen triple-helix. *Fluid Phase Equilibria*, 2014, 362(1): 113–117.
- [6] Lin YK, Kuan CY. Development of 4-hydroxyproline analysis kit and its application to collagen quantification. *Food Chem*, 2010, 119(3): 1271–1277.
- [7] Engel J, Bachinger HP. Structure, stability and folding of the collagen triple helix. *Topics Curr Chem*, 2005, 247: 7–33.
- [8] Deyl Z, Miksik I, Eckhardt A. Preparative procedures and purity assessment of collagen proteins. *J Chromat B*, 2003, 790(1/2): 245–275.
- [9] Nuntaporn A, Wunwiboon G. Temperature effects on type I pepsin-solubilised collagen extraction from silver-line grunt skin and its *in vitro* fibril self-assembly. *J Sci Food Agric*, 2010, 90(15): 2627–2632.
- [10] Wang L, Yang B, Du X. Extraction of acid-soluble collagen from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin. *J Food Process Eng*, 2009, 32(5): 743–751.
- [11] Pilar R, Silvia MA, Pablo AL, et al. A simple dot-blot–Sirius red-based assay for collagen quantification. *Anal Bioanal Chem*, 2013, 405(21): 6863–6871.
- [12] Lins da Silva CM, Spinelli E, Rodrigues SV. Fast and sensitive collagen quantification by alkaline hydrolysis/hydroxyproline assay. *Food Chem*, 2015, 173: 619–623.
- [13] Dong XB, Li X, Zhang CH, et al. Determination of collagen content in livestock and poultry ossein by spectrophotometry. *Mod Food Sci Technol*, 2013, 29(10): 2538–2541 (in Chinese).
董宪兵, 李侠, 张春晖, 等. 分光光度法测定畜禽骨素中胶原蛋白含量. *现代食品科技*, 2013, 29(10): 2538–2541.
- [14] Zheng YF, Zhu GQ, Zeng JH, et al. Identification of collagenous protein in dairy products by high performance liquid chromatography-mass spectrometry. *China Dairy Ind*, 2013, 41(9): 56–58 (in Chinese).
郑云峰, 诸葛庆, 曾金红, 等. 液相色谱-质谱联用测定乳制品中掺加胶原蛋白的方法研究. *中国乳品工业*, 2013, 41(9): 56–58.
- [15] Nayan JS, Venkataswarup T, Mohanakumar T. Detection of antibodies to self-antigens (k-alpha 1 tubulin, collagen I, II, IV, and V, myosin, and vimentin) by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Transpl Immunol Met in Mol Biol*, 2013, 1034: 335–341.
- [16] Nimptsch A, Schibur S, Ihling C, et al. Quantitative analysis of denatured collagen by collagenase digestion and subsequent MALDI-TOF mass spectrometry. *Cell Tissue Res*, 2011, 343(3): 605–617.
- [17] Cui L, Zhang GF, Liu T, et al. High performance chromatography/mass spectrometric analysis of the collagen I/III ratio in rat skin at different stages of growth. *China Biotechnol*, 2007, 27(4): 71–76 (in Chinese).
崔琳, 张贵锋, 刘涛, 等. 液相色谱-质谱联用法分析不同年龄鼠皮肤中 I 型、III 型胶原蛋白相对含量. *中国生物工程杂志*, 2007, 27(4): 71–76.
- [18] Sun AM, Zhang GF, Ni W, et al. HPLC/MS analysis of tryptic digest mixture of collagen. *China Biotechnol*, 2005, 25(2): 66–72 (in Chinese).
孙爱梅, 张贵锋, 倪文, 等. 胶原蛋白降解物高效液相色谱/质谱联用分析. *中国生物工程杂志*, 2005, 25(2): 66–72.
- [19] Wang J, Zhan XY, Teng YK, et al. Determination of the content of amino acid by precolumn derivatization and RP-HPLC. *J Shenyang Pharm Univ*, 2003, 20(6): 428–430 (in Chinese).
王棘, 战祥友, 腾艳坤, 等. DNFB 柱前衍生化 RP-HPLC 法测定氨基酸的氨基酸含量. *沈阳药科大学学报*, 2003, 20(6): 428–430.

-
- [20] Zhang GF, Liu T, Wang Q, et al. Identification of special peptides in digested gelatins by high performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Chin J Anal Chem*, 2008, 36(2): 1499–1504 (in Chinese).
张贵锋, 刘涛, 王前, 等. 高效液相色谱/质谱法识别不同明胶酶解产物中特征多肽. *分析化学*, 2008, 36(11): 1499–1504.
- [21] Liu MB, Lu HJ. C-terminal proteomics: strategies for characterization of protein C-terminus using MS-based techniques. *Chin J Biotech*, 2014, 30(7): 1083–1093 (in Chinese).
刘恣博, 陆豪杰. 基于生物质谱的蛋白质 C 末端研究进展. *生物工程学报*, 2014, 30(7): 1083–1093.
- [22] Wu GJ, Clerens SM, Farouk M. LC MS/MS identification of large structural proteins from bull muscle and their degradation products during post mortem storage. *Food Chem*, 2014, 150: 137–144.

(本文责编 陈宏宇)