

Nghiên cứu xây dựng quy trình định lượng collagen trong thực phẩm chức năng bằng phương pháp *LC-MS/MS*

Phạm Hoàng Anh¹, Võ Thị Bạch Huệ¹
Phan Thanh Dũng¹, Nguyễn Thị Ngọc Vân^{2*}

¹Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh

²Trường Đại học Y Dược Cần Thơ

Summary

A LC-MS/MS was developed for determination of collagen through a hydrolyzed product 4-hydroxy-L-proline. The chromatography was performed as: column BEH Amide (100 x 2.1 mm; 1.7 μ m); Mobile phase consists of acetonitrile / ammonium acetate 5 mM / formic acid 0.1 % and ammonium acetate 5 mM formic acid 0.1 % / water in gradient mode; Detector- triple quadrupole mass spectrometer system using positive electrospray ionization and Multiple Reaction Monitoring mode. The recoveries range between 100.8 - 109.8 % with RSD 2.83 %. The validation results show that method is suitable for the indirect determination of collagen in materials and natural products.

Keywords: Hydroxyprolin, hydrolyzed collagen, LC-MS/MS.

Đặt vấn đề

Collagen được tạo thành từ các acid amin và đặc biệt là hàm lượng của proline và 4-hydroxy-L-prolin (hydroxyprolin) cao hơn so với các loại protein khác [1]. Hydroxyprolin là một acid amin đặc trưng của collagen với hàm lượng chiếm khoảng 13,5 %; đóng vai trò ổn định cấu trúc xoắn của collagen bằng cách tạo liên kết hydro với các acid amin khác. Ngày nay, collagen được sử dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực như: Y học, dược phẩm, mỹ phẩm, thực phẩm chức năng (TPCN), đặc biệt tác dụng chống lão hóa da, ngăn ngừa và cải thiện nếp nhăn trên da. Hiện tại, trong Dược điển Việt Nam V, Dược điển Mỹ 40, Dược điển Anh 2019 chưa có chuyên luận collagen. Một số phương pháp được sử dụng để định lượng collagen như: Phương pháp tạo màu [2], phương pháp quang phổ hồng ngoại [3], sắc ký lỏng [4-5]. Do vậy,

cần nghiên cứu tìm phương pháp phân tích phù hợp để xác định hàm lượng collagen có trên thị trường với yêu cầu đơn giản, kinh tế và đạt độ nhạy cao. Chúng tôi tiến hành nghiên cứu với hai mục tiêu: (1) Xây dựng và thẩm định quy trình định lượng collagen có trong TPCN và nguyên liệu bằng phương pháp *LC-MS/MS* định lượng gián tiếp thông qua sản phẩm thủy phân hydroxyprolin; (2) Ứng dụng quy trình đã thẩm định để định lượng một số mẫu nguyên liệu, TPCN trên thị trường có chứa collagen.

Nguyên liệu và phương pháp

Chất đối chiếu, thiết bị, hóa chất, dung môi

Chất đối chiếu

Các chất chuẩn: *Trans*-4-Hydroxy-L-prolin (hàm lượng > 99 %) của Hãng Sigma-Aldrich, chất chuẩn collagen, bovin, type I (hàm lượng > 96 %) của Hãng Advanced BioMatrix.

Thiết bị

Hệ thống sắc ký lỏng siêu hiệu năng Acquity *UPLC*[®] H class kết hợp đầu dò TQ Detector (hãng Waters), cân phân tích Sartorius, cân phân tích UniBloc (hãng Shimadzu), cột BEH

Chịu trách nhiệm: Nguyễn Thị Ngọc Vân

Email: nguyenthingocvanct@gmail.com

Ngày nhận: 01/7/2020

Ngày phản biện: 23/7/2020

Ngày duyệt bài: 29/10/2020

HILIC kích thước 2,1 x 100 mm, cỡ hạt 1,7 µm và cột BEH Amide kích thước 2,1 x 100 mm, cỡ hạt 1,7 µm với tiền cột tương ứng. Máy đo pH Miwaukee và các thiết bị phân tích đã được hiệu chuẩn đạt quy định theo ISO 17025:2017.

Hóa chất, dung môi

Các hóa chất tinh khiết dùng cho **LC-MS** như acetonitril, methanol, amoni acetat, acid hydrochloric, acid formic.

Đối tượng nghiên cứu

Nguyên liệu collagen dạng bột và thực phẩm chức năng dạng viên và dạng bột.

Mẫu giả lập: Cân đồng lượng 5 loại bột collagen và 5 loại viên chứa collagen tương ứng với khối lượng trung bình của 20 viên. Trộn đều thu được mẫu giả lập.

Phương pháp nghiên cứu

Khảo sát điều kiện khối phổ và điều kiện sắc ký

Quy trình xử lý mẫu: Cân chính xác khoảng 2 mg collagen cho vào ống thủy tinh chịu nhiệt, thêm 1 mL acid hydrochloric 6 N và cho vào tủ sấy để thủy phân trong 6 giờ. Dịch thủy phân được chuyển vào bình định mức 20 mL và thêm dung dịch trung hòa đến vạch. Mẫu được pha loãng bằng dung dịch trung hòa đến nồng độ mong muốn và được lọc qua màng lọc nylon 0,22 µm trước khi đưa vào hệ thống **UPLC-MS/MS** để phân tích.

Khảo sát, lựa chọn điều kiện khối phổ:

Khảo sát lựa chọn các thông số nguồn ion hóa (kiểu ion hóa ES+ hay ES-), thế cone, thế mao quản, năng lượng va chạm (CE), thế phân mảnh (Fragmentor) để bắn phá ion mẹ thành các ion con đặc trưng. Ion có tín hiệu lớn và ổn định hơn được sử dụng để làm ion định lượng, ion còn lại được dùng cho mục đích định tính.

Lựa chọn điều kiện sắc ký:

Khảo sát các điều kiện bao gồm: lựa chọn pha tĩnh (khảo sát 2 loại cột: BEH HILIC và cột BEH Amide), pha động, chương trình rửa giải, tốc độ dòng để thu được sắc ký đồ có pic cân xứng, cường độ tín hiệu cao và ổn định. Thực hiện khảo sát 3 hệ pha động như sau: (1)

Acetonitril/10 mM amoni acetat và nước/10 mM amoni acetat; (2) acetonitril/0,1 % acid formic và nước/0,1 % acid formic; (3) Acetonitril/10 mM amoni acetat/0,1 % acid formic và nước/10 mM amoni acetat/0,1 % acid formic. Ở mỗi hệ pha động, tiến hành các chế độ gradient khác nhau với tỷ lệ dung môi hữu cơ tăng dần từ 60 đến 80 %.

Xử lý số liệu: Sử dụng phần mềm SPPSS Inc, Microsoft Excel để tính toán và xử lý thống kê.

Thẩm định quy trình

Thẩm định quy trình theo hướng dẫn của AOAC [6] gồm tính tương thích hệ thống, tính đặc hiệu, độ đúng, độ chính xác, tính tuyến tính. Quy trình sau khi thẩm định đạt yêu cầu sẽ được áp dụng để phân tích các chế phẩm trên thị trường.

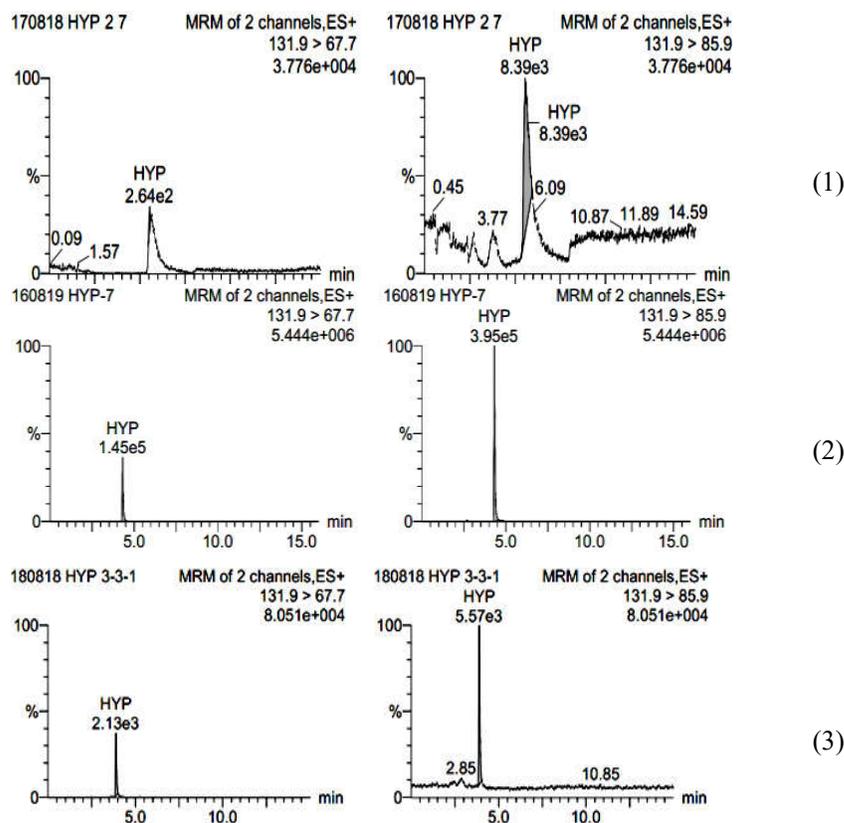
Kết quả và bàn luận

Kết quả khảo sát điều kiện khối phổ

Kết quả khảo sát điều kiện khối phổ cho thấy thông số *m/z* của *trans*-4-hydroxy-L-prolin với kỹ thuật ghi phổ MRM, chế độ ion dương (ESI+) 1 ion phân tử (*m/z* = 131,9) và 2 ion sản phẩm, trong đó có 1 ion sản phẩm dùng để định tính (*m/z* = 85,9) và 1 ion sản phẩm dùng để định lượng (*m/z* = 67,7). Theo quy định 2002/657/EC của Châu Âu, số điểm xác nhận đạt được là 4 điểm, đạt yêu cầu.

Khảo sát điều kiện sắc ký

Từ kết quả khảo sát cho thấy, với cột BEH HILIC nhận thấy chân pic giãn rộng, không có tính lặp lại khi tiêm 6 lần (RSD % diện tích đỉnh = 14,40 %). Với cột BEH Amide, pic hẹp nhọn, có tính lặp lại (RSD % diện tích đỉnh = 3,74 %) trong giới hạn cho phép (≤ 5 %). Nguyên nhân, do cột BEH HILIC phù hợp để lưu giữ những chất phân cực có tính base, hydroxyprolin ở dạng base sẽ tồn tại dạng ion âm nên không phù hợp với sự tạo ion tại buồng ion hóa (ESI+). Vì vậy tín hiệu thu được trên cột HILIC không ổn định. Ngược lại, với cột BEH Amide phù hợp lưu giữ những chất phân cực ở cả dạng acid, base và trung tính, nên phù hợp để lưu giữ ion dương hydroxyprolin. Do đó, cột BEH Amide phù hợp để phân tích hydroxyprolin.



Hình 1. Sắc ký đồ khảo sát điều kiện ở 3 hệ pha động

Kết quả khảo sát điều kiện pha động:

Kết quả khảo sát các điều kiện pha động cho thấy ở hệ pha động (1) pic bị kéo đuôi, chân pic giãn rộng. Hệ pha động (2) và (3) cho hình dạng pic nhọn, chân pic hẹp và khi tăng nồng độ acetonitril thì thời gian lưu và diện tích pic càng lớn. Tuy nhiên, khi tiến hành tiêm lặp lại 6 lần trên cùng một mẫu chuẩn thì hệ pha động (2) không có tính lặp lại (RSD > 10 %) trong khi đó hệ pha động (3) có tính lặp lại cao (RSD < 2 %). Nên nghiên cứu lựa chọn hệ pha động (3).

Điều kiện tối ưu cho pha động sử dụng chế độ gradient với tỷ lệ như bảng 1.

Bảng 1. Chế độ gradient pha động

Phút	Acetonitril + 5 mM amoni acetat + 0,1% acid formic	Nước + 5 mM amoni acetat + 0,1% acid formic
0,0	95	5
0,5	75	25
6,5	95	05
16,5	95	05

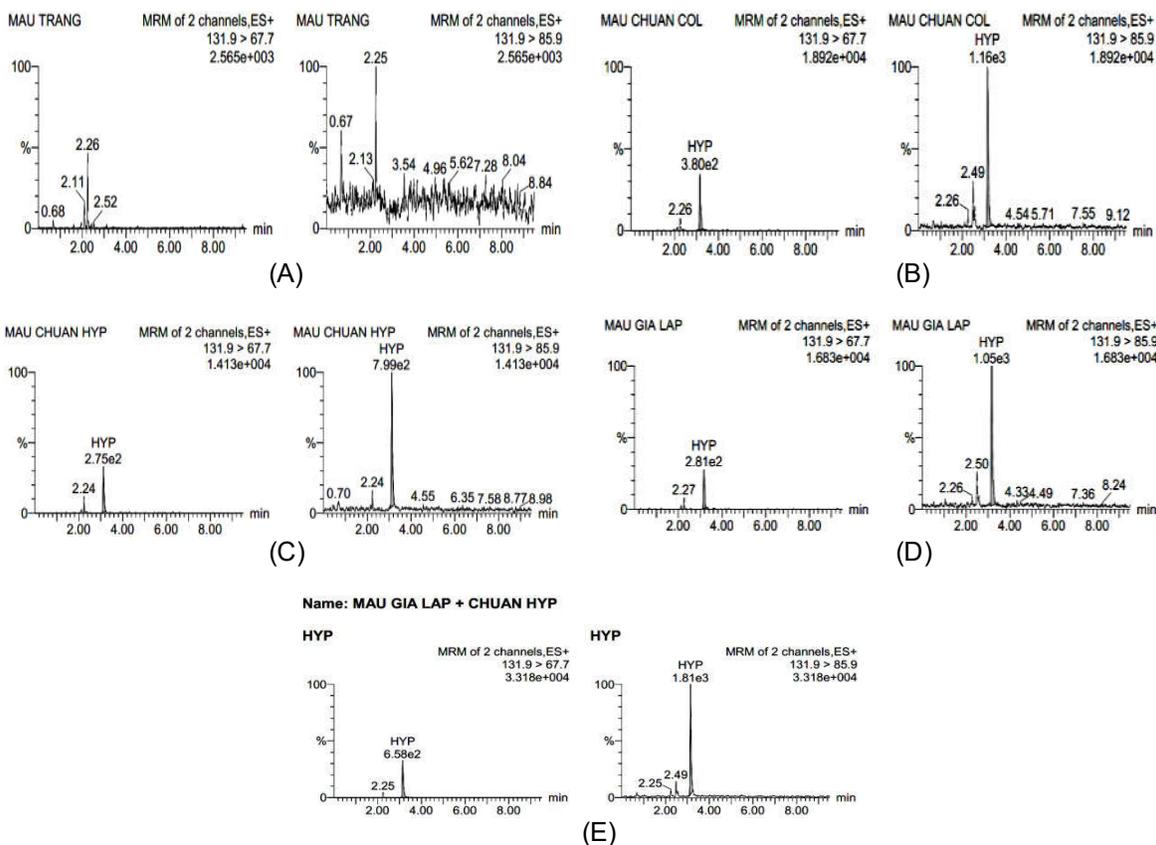
Thẩm định quy trình

Tính tương thích hệ thống

Tiêm lặp lại 6 lần dung dịch chuẩn hydroxyprolin nồng độ 135 ng/mL. Kết quả ở cho thấy RSD thời gian lưu và diện tích đỉnh đều < 2 %, quy trình đạt tính tương thích hệ thống.

Tính đặc hiệu

Tiến hành phân tích mẫu trắng, mẫu chuẩn, mẫu giả lập và mẫu giả lập thêm chuẩn. Kết quả phân tích được trình bày trong hình 2 cho thấy ở sắc ký đồ mẫu trắng không xuất hiện pic trùng với thời gian lưu với chất phân tích so với sắc ký đồ của chất chuẩn. Trên sắc ký đồ của mẫu giả lập thêm chuẩn có xuất hiện pic có thời gian lưu trùng với chất phân tích trong mẫu chuẩn (hình 3). Hơn nữa, hydroxyprolin có hai ion sản phẩm dùng để định tính và định lượng, phương pháp đạt yêu cầu số điểm xác nhận tối thiểu với hoạt chất là 4 điểm. (1 ion mẹ và 2 ion con). Như vậy, phương pháp có tính đặc hiệu đạt yêu cầu.



Hình 2. Sắc ký đồ tính đặc hiệu: (A) Mẫu trắng; (B) Mẫu chuẩn collagen; (C) Mẫu chuẩn hydroxyproline; (D) Mẫu giả lập; (E) Mẫu giả lập + chuẩn hydroxyproline

Tính tuyến tính

Quy trình phân tích đạt tính tuyến tính với hệ số tương quan > 0,997 trong khoảng nồng độ hydroxyprolin từ 15,6 ng/mL đến 500 ng/mL, nồng độ collagen từ 31,2 ng/mL đến 1.000 ng/mL.

Độ đúng và độ chính xác

Tiến hành sắc ký mẫu thử thêm chuẩn ở 3 mức nồng độ 50, 100, 150 µg/mL. Ở mỗi nồng độ chuẩn bị 3 mẫu phân tích trong một ngày, trong 3 ngày liên tiếp. Quy trình đạt độ đúng và độ chính xác. Kết quả khảo sát độ đúng và độ chính xác của quy trình phân tích được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Kết quả khảo sát độ đúng, độ chính xác

Mức thêm chuẩn	Nồng độ (µg/mL)	Nồng độ tìm lại	Độ thu hồi (%)	RSD%
50 %	68,25	68,76	100,8	3,90
	68,25	72,32	106	
	68,25	74,3	108,9	
100 %	91	97,2	106,8	2,67
	91	94,75	104,1	
	91	99,9	109,8	
150 %	113,75	118,04	103,8	2,76
	113,75	121,46	106,8	
	113,75	124,74	109,7	

Ứng dụng quy trình

Quy trình định lượng sau khi thẩm định đạt yêu cầu đã được ứng dụng để phân tích 10 mẫu thực được thu thập trên thị trường. Kết quả phân tích được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. Kết quả phân tích mẫu thực tế trên thị trường

Mẫu	Dạng bào chế	Lượng mẫu cân (mg)	% collagen
1	Bột (nguyên liệu)	2,15	97
2	Viên nang	2,05	73
3	Viên nang	2,10	64
4	Viên nén	2,01	57
5	Viên nén	2,02	63
6	Viên nang	2,02	70
7	Bột pha uống	2,01	57
8	Bột pha uống	2,11	73
9	Bột pha uống	2,16	59
10	Bột pha uống	2,25	51

Kết luận

Nghiên cứu đã xây dựng quy trình định lượng collagen gián tiếp thông qua hydroxyprolin trong thực phẩm chức năng, nguyên liệu bằng phương pháp **LC-MS/MS**. Quy trình đơn giản với độ tin cậy cao. Quy trình phân tích đã được thẩm định đạt tính tương thích hệ thống, tính đặc hiệu, tính tuyến tính, độ lặp lại, độ đúng. Quy trình đã được ứng dụng để

xác định hàm lượng collagen có trong một số chế phẩm thực phẩm chức năng, nguyên liệu đang lưu hành trên thị trường.

Tài liệu tham khảo

1. Morten A. Karsdal (2016), "Biochemistry of collagens, laminins and elastin structure, function and biomarkers", *Elsevier Inc.*
2. Neuman R. E., Logan M. A. (1950), "The determination of collagen and elastin in tissues", *J. Biol. Chem.*, 186, pp. 549-556.
3. Hanifi A., Roberts S., Mc Carthy H., Pleshko N. (2012), "Semi-quantitative analysis of type II collagen distribution in normal and repair cartilage using multivariate analysis of FT-IR spectra", *ORS Annual Meeting.*, pp. 1450.
4. Vatansever B., Binici B. (2015), "A quantitative method for the measurement of hydrolyzed type-I collagen protein in dietary supplement syrup using HPLC-SEC-UV technique", *J. of Chem. Metrology.*, 9 (1), pp. 1-15.
5. Taga Y., Kusubata M., Ogawa-Goto K., Hattori S. (2014), "Stable isotope-labeled collagen: A novel and versatile tool for quantitative collagen analyses using mass spectrometry", *J. Proteome Res.*, 13, pp. 3671-3678.
6. AOAC SMPR 2016.005 (2016), "Standard method performance requirements (SMPRs®) for quantitation of collagen", *AOAC SMPR.*