

用Q Exactive高分辨质谱定量血清中胰岛素

唐家澍 赛默飞世尔科技(中国)有限公司色谱质谱部

关键词:

胰岛素, Q Exactive高分辨质谱, 临床检测, Vanquish, MSIA

前言

胰岛素是人体内调控血糖稳态最重要的激素之一, 从上世纪80年代开始, 各制药公司开始生产各种胰岛素类似物, 以满足不同的药代动力学需求, 例如速效胰岛素类似物门冬胰岛素 (insulin aspart) 和长效胰岛素类似物甘精胰岛素 (insulin glargine) 等。对于血清胰岛素的定量以往主要采用免疫法, 但采用免疫法检测胰岛素也存在着以下不足。第一, 目前各厂家商业化的免疫试剂盒并未向国际标准物质进行溯源, 导致各厂家检测的同一样本可能存在两倍的偏差[1]。第二, 病人血清中自抗体和异嗜性抗体的存在也会干扰免疫法的定量结果。第三, 由于胰岛素类似物药物和内源胰岛素的序列高度相似, 不同厂家的免疫试剂盒对于胰岛素类似物的区分能力各不相同, 极大的影响了血清中内源胰岛素和胰岛素治疗类似物的定量。

目前, 基于质谱的临床检测方法已经被越来越多的医院检验科和临床实验室所追捧。质谱法有出色的灵敏度, 特异性和稳定性, 在一些领域中, 例如新生儿代谢性疾病的筛查, 维生素D的检测等, 已成为了首选的检测方法。基于质谱的检测方法目前主要依赖三重四级杆质谱仪进行选择反应监控 (selected reaction monitoring, SRM) 的扫描方式, 这种扫描方式对于绝大多数小分子化合物, 肽段和蛋白质都获得了良好的检测效果。而胰岛素由于存在3个稳定二硫键, 碎片离子少, 所以采用选择反应监控来分析完整胰岛素变得尤为困难。实际上, 美国的大型独立第三方医学实验室Quest在用质谱分析胰岛素时, 需要用还原剂打开胰岛素的二硫键, 通过分析胰岛素的B链来代替完整胰岛素[2]。在这篇文章中, 我们利用Orbitrap超高分辨质谱得到高精度的一级质谱信息来分析完整胰岛素, 从而绕开胰岛素不容易产生碎片离子的问题。此外, 对于胰岛素这一类大肽段

类分析物, 合适的色谱分析条件也尤为重要, 我们使用ProSwift RP-4H整体柱获得了极佳的分析效果。

实验方法

1. 仪器和耗材

质谱仪器: Q-Exactive高分辨质谱仪

液相色谱: Vanquish Flex 超高压二元液相色谱仪

色谱柱: ProSwift RP-4H整体柱, 0.5 μ m * 10cm

2. 仪器和分析方法

色谱方法: 见表1.

质谱方法: 见表2

流动相	A 0.2%FA 水溶液	
	B 0.2%FA 乙腈溶液	
色谱梯度		
Time (min)	Flow (mL/min)	%B
0.0	0.2	10
0.7	0.2	10
1.0	0.2	20
1.5	0.2	25
3.5	0.2	36
3.6	0.2	36
3.8	0.2	90
4.8	0.2	90
5.0	0.2	10
8.0	0.2	10

表1. ProSwift整体柱分析胰岛素色谱条件

源参数		质谱参数	
Sheath gas	30	SIM scan	
Aux gas	10	Resolution	70K
Sweep gas	0	Isolation window	20Th
Spray voltage	3.8Kv	Central Mass	1160
Capillary temp	280	AGC target	1e5
Probe heater temp	400	MaxIT	200ms
S-lens RF	70	MicroScan	1
Probe height	B	Data type	Profile
离子通道		使用软件	
人胰岛素定量离子	1162.332	数据采集	Xcalibur
人胰岛素定性离子1	1162.139	定量分析	TraceFinder 4.1
人胰岛素定性离子2	1162.534	离子抽取窗口	15ppm
猪胰岛素定量离子	1156.336		

表2. QE分析胰岛素质谱条件

实验结果和讨论

1. 利用高分辨一级质量信息进行定量和定性

在目前的色谱条件下，人源和猪源胰岛素主要存在+4, +5和+6三个价态的母离子，其中+5价的母离子强度最高（图1.）。最后我们选择1162.332这个强度最高的单同位素峰作为定量离子，而其旁边的两个单同位素峰（1162.139, 1162.534）作为定性离子（图1）。1162.139/1162.332的理论离子比例（ion ratio）为0.84, 1162.534/1162.332的理论离子比例为0.93, 在实际检测中，我们要求定性离子的离子比例偏差不得超过±15%。我们用猪源胰岛素+7价母离子最高的单同位素峰1156.336作为内标离子，来消除实验间的偏差。由于我们在质谱采集时使用了70,000的分辨率（表1），所以理论上我们可以使用5ppm的允许质量偏差进行离子抽取，但在实际检测工作中为了使得方法更加稳健，我们将允许的质量偏差窗口放宽到15ppm。

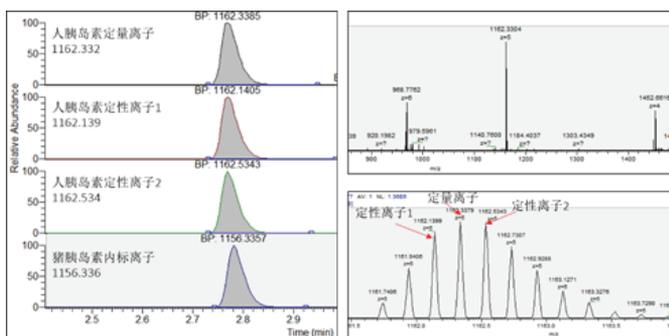


图1. 用QE检测胰岛素的定量，定性和内标离子的色谱质谱图

对于胰岛素这类分子量比较大的肽段，选择合适的色谱条件尤为重要。色谱填料孔径过小可能导致蛋白质直接流穿，无法和键合相结合。在进行微量样品分析时，不合适的材质会导致蛋白的非特异性吸附，从而影响色谱峰型，甚至导致无法检测到被分析物。在这次实验中，我们比较了普通的C18硅胶柱和ProSwift RP-4H整体柱对胰岛素分离的表现。普通硅胶柱分析胰岛素时产生了明显的拖尾，并且在50针进样后色谱峰型变得非常差（图2A）。ProSwift RP-4H是一种苯基性质的整体柱，

并且柱套采用了生物兼容的PEEK材质，由于整体柱背压非常低，所以采用PEEK材质不会因为耐压不够而无法使用。采用ProSwift RP-4H分析胰岛素取得非常好的色谱峰型，峰宽在6s左右，完全没有拖尾。并且在100针后还保持完全一致的峰型和保留时间（图2B）。

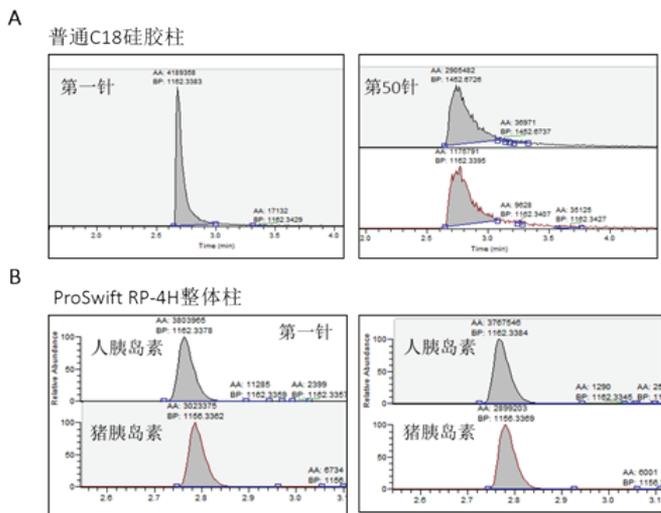


图2. 用ProSwift RP-4H色谱柱检测胰岛素的色谱表现

2. 线性范围，准确度和精密度

WHO提供的成年人空腹胰岛素参考范围为3.0-24.9 uIU/ml，即21 - 173pmol/L。因此我们将标准曲线的范围定为18.75 - 2400 pmol/L，考虑样品前处理的回收率，即在色谱柱上的上样量为1.56 - 200 fmol。由表3和表4可见，标准曲线表现出了极佳的线性（图3A），并且标准曲线各点和实际偏差均小于10%。基质加标准品的样品中，内标的变异系数小于5%（表4）。由图3B可见，LLOQ点（18.75pmol/L）的定量和定性离子依旧展现出了良好的色谱峰型和极佳的信噪比，而溶剂空白则完全无法抽提出人胰岛素的定量和定性离子色谱峰（图3C）。

被分析物	标准曲线范围	r2, 线性拟合, 1/x权重	LLOQ	内标CV
人胰岛素	18.75 - 2400pmol/L	0.9993	18.75pmol/L	4.32%

表3. QE检测人胰岛素标准曲线范围和r2

	STD1	STD2	STD3	STD4	STD5	STD6	STD7	STD8
On column (fmol)	1.5625	3.125	6.25	12.5	25	50	100	200
血清浓度(pmol/L)	18.75	37.5	75	150	300	600	1200	2400
定性离子1离子比例	0.86	0.81	0.83	0.85	0.83	0.84	0.85	0.85
定性离子2离子比例	0.97	0.96	0.94	0.94	0.93	0.94	0.94	0.93
回收率	93.3%	95.1%	98.9%	101.2%	104.6%	101.2%	105.6%	99.6%

表4. QE检测人胰岛素标准曲线各点离子比例和回收率

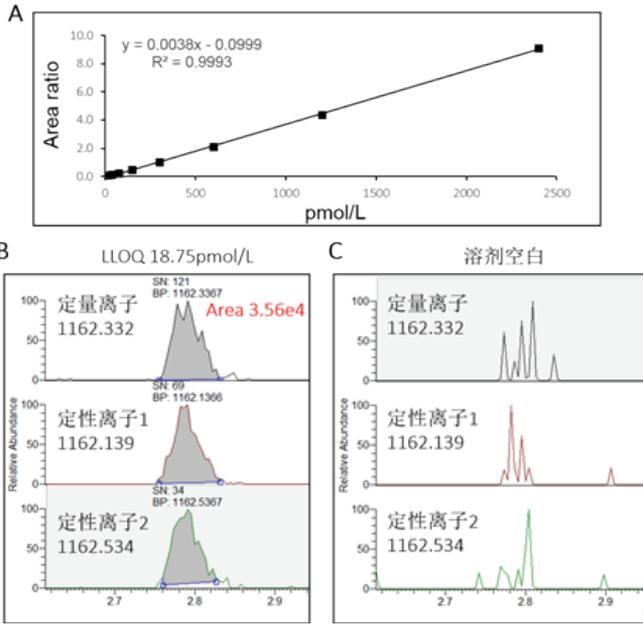


图3. 标准曲线和LLOQ以及溶剂空白的色谱图

3. 在三重四级杆上采用选择反应监控模式来进行定量和定性

随后我们考察了在三重四级杆质谱仪TSQ Endura上能否获得好的检测效果。由于胰岛素有三对二硫键（图4A），所以仅有B链的C端能产生碎片离子，且产生的碎片过短，因此在实际病人血清样品分析是无法提供非常良好的特异性（图5B, C）。对于人胰岛素，我们选择1162.332 -> 226.1 离子对作为定量离子，对应B链的(y3-y1)+离子，1162.332 -> 345.2 作为定性离子，对应B链的y3+离子，其理论离子比例（ion ratio）为0.305。对于内标离子，我们选择了次高的离子对1156.33 -> 315.2，对应猪胰岛素B链的y3+离子，以期获得稍好的特异性。实际结果显示标准曲线的最低点（18.75 pmol/L）的定量变异系数较大，且定性离子的离子比例也未能达到预期（表5）。

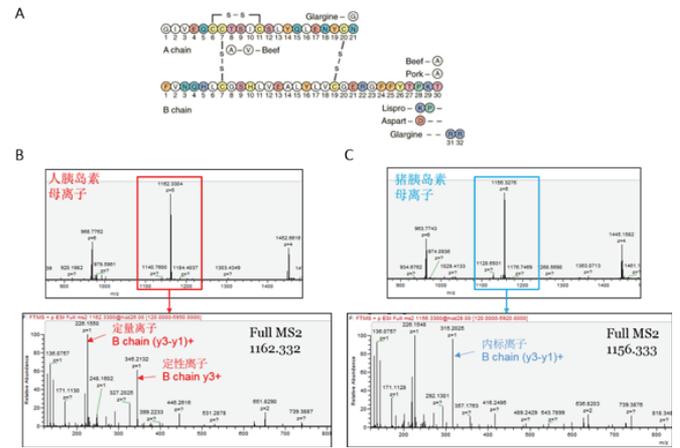


图4. 胰岛素序列信息和二级质谱图

	STD1	STD2	STD3	STD4	STD5	STD6	STD7	STD8
On column (fmol)	1.563	3.125	6.25	12.5	25	50	100	200
血清浓度 (pmol/L)	18.75	37.5	75	150	300	600	1200	2400
Area ratio	0.042	0.098	0.178	0.549	0.971	2.369	5.236	10.339
CV%	20.4	1.4	7.7	6.0	6.2	9.6	1.8	0.3
定性离子离子比例	0.361	0.249	0.255	0.333	0.328	0.322	0.306	0.312

表5. TSQ Endura检测人胰岛素标曲各点的面积比和离子比例

结论

在本工作中，我们使用ProSwift RP-4H色谱柱来实现胰岛素的色谱分离，获得非常好的效果。由于胰岛素含有3对稳定二硫键，因此采用选择反应监控时其碎片离子特异性不高，而使用Orbitrap超高分辨质谱用高精度的一级母离子信息来进行定量则能取得更好的定量效果。在胰岛素样品的前处理上，我们可以使用MSIA @高度自动化的免疫富集方案（图5），使得高灵敏度，高特异性和高通量可以兼得。

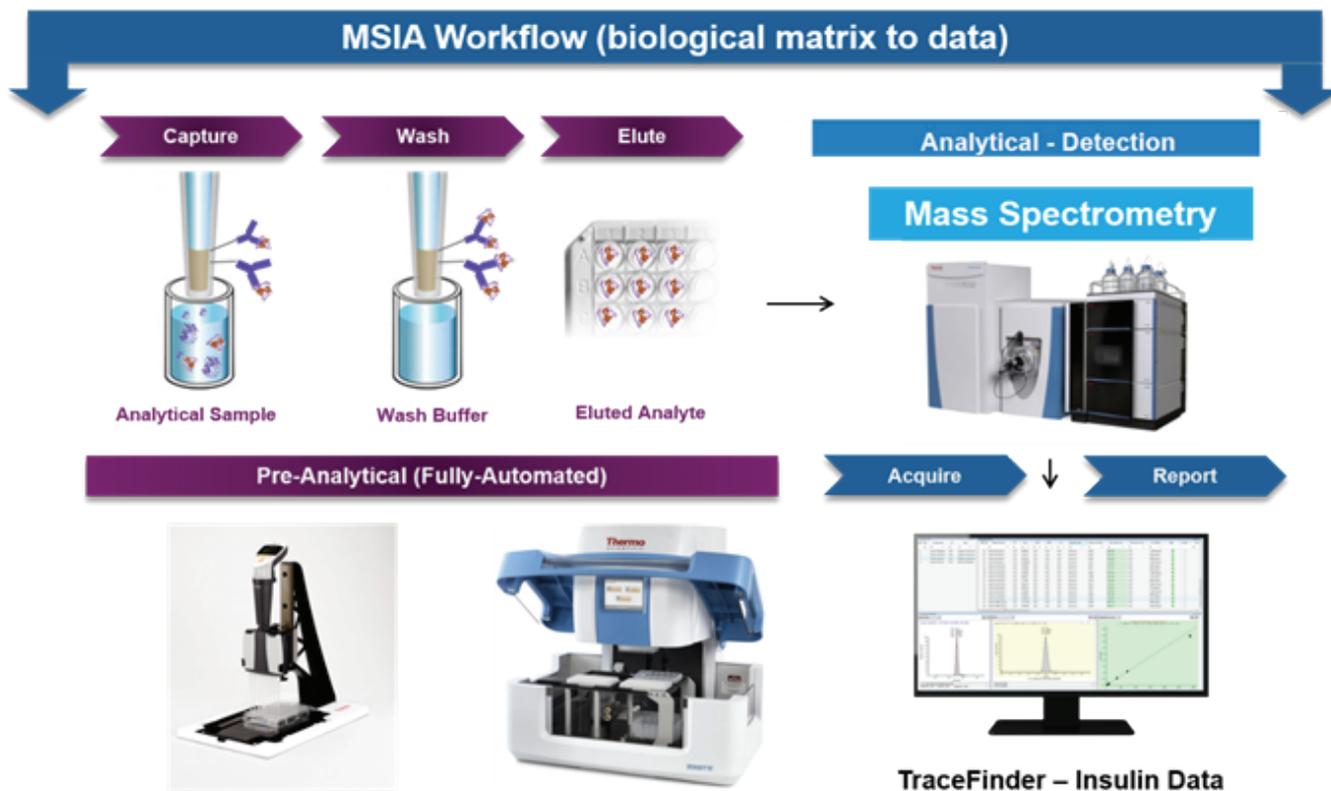


图5. MSIA 免疫富集质谱检测方案

参考文献

1. Manley, S.E., et al., Comparison of 11 human insulin assays: implications for clinical investigation and research. Clin Chem, 2007. 53(5): p. 922-32.
2. Chen, Z., et al., Quantitative insulin analysis using liquid chromatography-tandem mass spectrometry in a high-throughput clinical laboratory. Clin Chem, 2013. 59(9): p. 1349-56.



赛默飞
官方微信

热线 800 810 5118
电话 400 650 5118
www.thermofisher.com