

Nexera Mikros 微流量在线捕集系统检测乳糖辅料中微量 α -乳白蛋白

LCMSMS-388

摘要：本实验使用岛津微流量系统 Nexera Mikros 建立了乳糖辅料中 α -乳白蛋白 (α -La, α -Lactalbumin) 的定量分析方法, 考察了 Nexera Mikros 直接进样系统与岛津超高效液相色谱 LC-30A 结合 LCMS-8060 三重四极杆质谱联用仪在 α -乳白蛋白的灵敏度差异。2 μ L 进样体积下, 50 nmol/L α -乳白蛋白标准溶液, Mikros 比 LC-30A 灵敏度提升了约 7.4 倍。使用 Nexera Mikros 在线捕集洗脱系统, 乳糖在 Trap 柱上不保留, 仅对乳清蛋白的特征肽段在线富集并检测, 避免高浓度乳糖堵塞微流量系统。实验结果表明: Nexera Mikros 在线捕集系统情况下, 以 10 μ L 体积为进样量, 捕集效率约为 32%。 α -乳白蛋白特异肽段在 5~200 nmol/L 浓度范围内的标准曲线相关系数良好 ($R=0.9965$), 标线各点的准确度范围在 94.0~115.9%; 5 和 50 nmol/L 浓度的标准溶液平行测定 6 次, 保留时间的 RSD 不大于 0.06%, 峰面积 RSD 不大于 9.92%。多份实际样品均检出 α -乳白蛋白。

关键词：液相色谱 - 三重四极杆质谱 乳糖 α -乳白蛋白

乳糖做为药用辅料的历史已经超过了二个世纪, 广泛用于口服胶囊剂和片剂的稀释剂。药用乳糖辅料的生产工艺是以牛乳清为原料。牛乳清是牛奶经提炼出奶酪和酪蛋白后的残留液体。因此乳糖辅料的生成过程中难以避免会残留微量的牛奶过敏原, 如乳清蛋白、乳白蛋白等, 其含量极低, 用常规 LCMS 难以检测。

岛津 Nexera Mikros 微流量液质联用系统, 可对应从微量流速 (1 μ L/min~100 μ L/min) 到半微量流速 (100 μ L/min~500 μ L/min) 的宽流速范围。相比半微量液相

色谱, Nexera Mikros 在与 LCMS 联用检测目标化合物时可以获得更高的灵敏度; 与纳升 LCMS 系统相比, 可以获得更短的分析时间和更好的稳定性。

岛津微流量液质联用系统 Nexera Mikros, 采用了新型微流量送液泵及样品导入质谱时的角度、位置均优化过的离子化接口, 减少样品基质效应及质谱污染, 实现较高的分析灵敏度。利用捕集洗脱系统的富集除杂功能, 结合 Mikros 高灵敏度特性, 实现乳糖辅料中微量 α -乳白蛋白检测。

■ 实验部分

1.1 Nexera Mikros 在线捕集浓缩系统

仪器: 岛津微流量液相色谱仪 Nexera Mikros 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用在线捕集浓缩系统。具体配置为: LC-30AD \times 2(捕集流路), LC-Mikros 输液泵 (分析流路), DGU-20A5R 在线脱气机, SIL-30AC 自动进样器 (15 μ L 定量环), CTO-40M 柱温箱, CBM-20A 系统控制器, Option Box VP, FCV-32AH, LCMS-8060 三重四极杆质谱仪配 Micro-ESI 8060 离子源, LabSolutions Ver. 5.93 色谱工作站。



图1 Nexera Mikros捕集洗脱系统示意图

1.2 分析条件

液相色谱条件:

色谱柱: Shim-pack MC-C18 (0.3 mm I.D.
×50 mm L., 1.9 μm)

流动相: A相 -0.1% 甲酸水溶液;
B相 -0.1% 甲酸乙腈溶液

流速: 5.0 μL/min

捕集柱: Shim-pack MC-C18 (0.3 mm I.D.
×35 mm L., 1.9μm)

捕集流动相: C- 水; D- 乙腈

捕集流速: 40 μL/min

柱温: 40°C

进样量: 10 μL

自动进样器温度: 10°C

洗脱方式: 梯度洗脱, B相初始浓度为 10%, 时
间程序见表 1。

表1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
2.00	Option Box vp	Valve A Position	1
2.10	泵	Pump A B.Conc	10
3.10	泵	B.Flow	0.04
3.10	泵	C.Flow	0
3.20	泵	B.Flow	0
3.20	泵	C.Flow	0.04
4.20	泵	Pump A B.Conc	24
4.30	泵	Pump A B.Conc	100
8.00	泵	B.Flow	0
8.00	泵	C.Flow	0.04
8.00	泵	Valve A Position	0
8.10	泵	B.Flow	0.04
8.10	泵	C.Flow	0
10.00	泵	Pump A B.Conc	100
10.10	泵	Pump A B.Conc	10
17.00	控制器	Stop	

质谱条件:

离子源: ESI (+)

雾化气流速: 1.5 L/min

加热气流速: OFF

接口温度: OFF

DL 温度: 250°C

接口电压: 2 kV

加热模块温度: 400°C

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

干燥气流速: OFF

MRM 参数: 见表 2

表2 MRM优化参数

选择的肽段	前体离子(m/z)	产物离子(m/z)	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
α-乳白蛋白	600.95	284.10*	-22.0	-31.0	-21.0
特异肽段		355.20	-22.0	-29.0	-17.0

注: *表示定量离子

1.3 LC-30A+LCMS-8060

仪器：

岛津超高效液相色谱 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用系统。具体配置为：LC-30AD×2 输液泵，DGU-20A5R 在线脱气机，SIL-30AC 自动进样器，CTO-Mikros 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8060 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.93 色谱工作站。

分析条件（参考岛津应用文集 LCMSMS-196）

液相色谱条件：

色谱柱：Shim-pack GIST C18 (2.0 mm I.D. ×100 mm L., 1.9 μm)

柱温：40°C

进样量：2 μL

流动相：A 相 -0.1% 甲酸水溶液；

自动进样器温度：10°C

B 相 -0.1% 甲酸乙腈溶液

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 5%，时间程序见表 3。

流速：0.4 mL/min

表3 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.80	泵	B.Conc	5
1.20	泵	B.Conc	10
2.50	泵	B.Conc	17
2.60	泵	B.Conc	22
4.20	泵	B.Conc	24
4.30	泵	B.Conc	100
5.00	泵	B.Conc	100
5.10	泵	B.Conc	5
8.00	控制器	Stop	

质谱条件（LC-30A+LCMS-8060）：

离子源：ESI (+)

扫描模式：多反应监测 (MRM)

干燥气流速：10.0 L/min

接口温度：300°C

雾化气流速：3.0 L/min

驻留时间：47ms

加热模块温度：400°C

DL 温度：250°C

加热气流速：10.0 L/min

接口电压：+4.5 kV

1.4 标准品与试剂

牛 α-乳白蛋白特异肽段标准品（序列：VGINYWLAHK，分子量 1200.4 Da，纯度 ≥ 99%）；乙腈购自 Merck 公司；实验用水由 Milli-Q Plus 水净化系统（Millipore, Ltd.）经去离子与二次净化制得；甲酸（纯度 99%，Wako, Japan）；其余试剂均为分析纯；碱性胰蛋白酶：活力大于 10000 BAEE 每毫克蛋白质。

碳酸氢铵溶液 (500 mmol/L)：称取碳酸氢铵 3.95 g，用水溶解后定容至 100 mL；二硫苏糖醇溶液 (500 mmol/L)：二硫苏糖醇 0.771 g 用碳酸氢铵溶液定容至 10 mL；

碘代乙酰胺溶液 (500 mmol/L)：称取碘代乙酰胺 0.925 g 碳酸氢铵溶液定容至 10 mL；

氯化钙溶液 (100 mmol/L)：称取氯化钙 0.111 g，用水溶解后定容至 10 mL；

乙酸溶液 (1%，V/V)：移取乙酸 0.1 mL，用水稀释并定容至 10 mL；

胰蛋白酶溶液 (500 μg/mL)：称取胰蛋白酶 5 mg，用乙酸溶液溶解后定容至 10 mL。

1.5 对照品溶液及内标溶液的配制

牛 α -乳白蛋白特异肽段标准储备溶液 (500 $\mu\text{mol/L}$): 准确称取牛 α -乳白蛋白特异肽段固体 6.00 mg (准确至 0.01 mg), 用水溶解并定容至 10 mL, 混匀。将配制的溶液转移到塑料瓶中, 置于冰箱内冷冻保存。

标准系列工作溶液: 分别吸取特异肽段标准中间混合溶液, 用 0.1% 甲酸水溶液稀释, 得 α -乳白蛋白特异肽段浓度为 5、10、25、50、200 nmol/L 的标准系列工作溶液。临用前配制。

1.6 样品制备

精确称取乳糖试样约 0.2 g 于 2 mL 离心管中, 溶解后用水定容至 1 mL, 离心取上清液, 备用。准确移取 200 μL 试样溶液, 于 2 mL 离心管中, 加入 10 μL 二硫苏糖醇溶液, 混匀, 置于 50 $^{\circ}\text{C}$ 下恒温反应 30 min; 冷却至室温, 加入 30 μL 碘代乙酰胺溶液, 暗处静置 30 min; 完成后加入 630 μL 碳酸氢铵溶液和 10 μL 氯化钙溶液和 50 μL 胰蛋白酶溶液, 混匀, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 下恒温酶解 5 小时及以上。加入 20 μL 甲酸, 混匀, 室温下静置 15 min, 混匀, 用 0.22 μm 滤膜过滤, 供液相色谱串联质谱仪检测。

结果与讨论

2.1 灵敏度比较

为了客观的比较 Mikros 系统与常规液相的灵敏度, 两个系统均采用直接进样方式, 噪音计算方法选择 ASTM 法, 噪音选择范围设置为各峰前后 3 区, 间隔 0.5 min。2 μL 进样体积下, 5 nmol/L α -乳白蛋白标准溶液 Mikros 信噪比 6.9, 常规 LCMS 未检出; 50 nmol/L α -乳白蛋白标准溶液 Mikros 信噪比 79.7, 常规 LCMS 信噪比 10.7, Mikros 比常规液相灵敏度提升了约 7.4 倍。

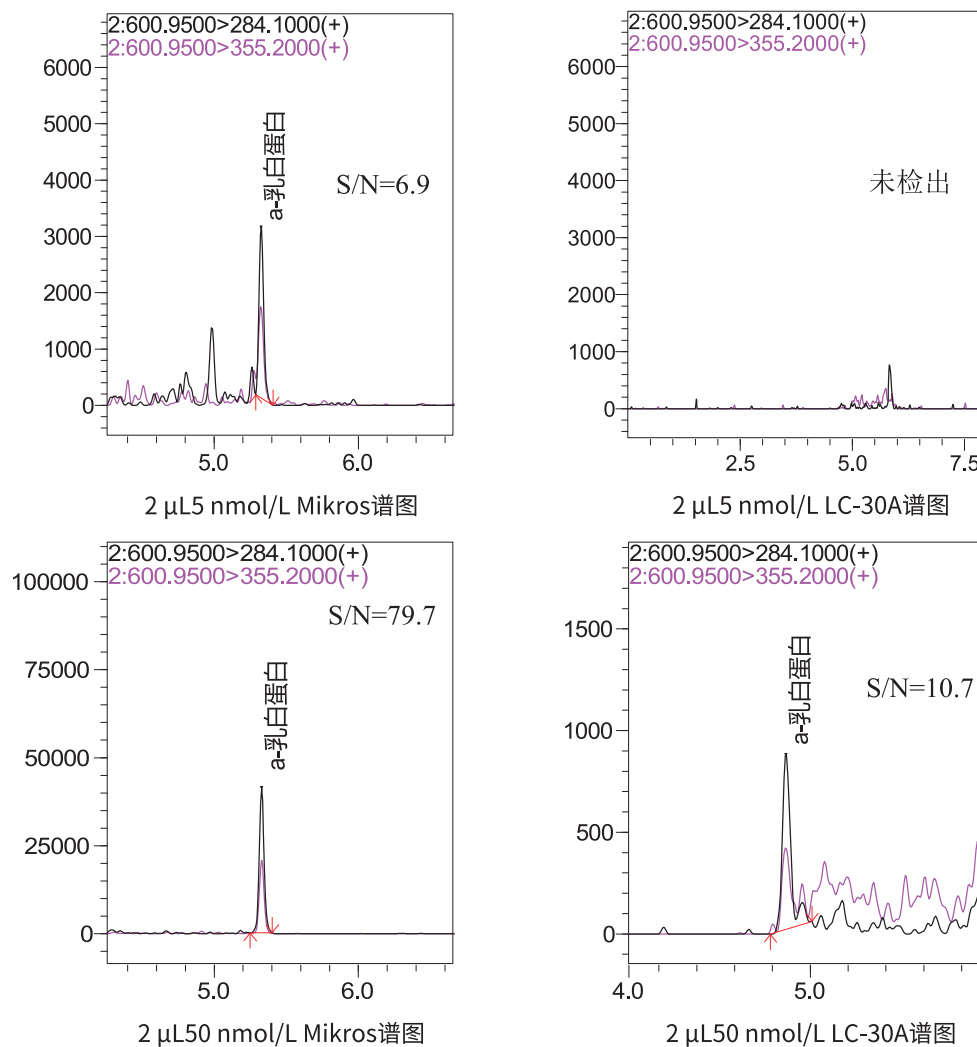


图2 NexeraMikros与LC-30A系统谱图对比

2.2 捕集效率考察

由于实际样品中含有 200 g/L 乳糖，直接进样易堵塞系统。本实验使用捕集洗脱系统进行检测。样品中残留的乳糖在 Trap 柱上不保留，仅对 α -乳白蛋白的特征肽段在线富集并浓缩。捕集系统的进样体积为 10 μ L, 25 nmol/L α -乳白蛋白标准溶液 Mikros 直接进样和 Mikros 捕集洗脱系统色谱图见图 3。样品经捕集系统浓缩，信噪比提升 2.4 倍，峰高提升约 1.5 倍。考虑到进样体积的差异，用峰面积之比折算出捕集效率约为 32%。

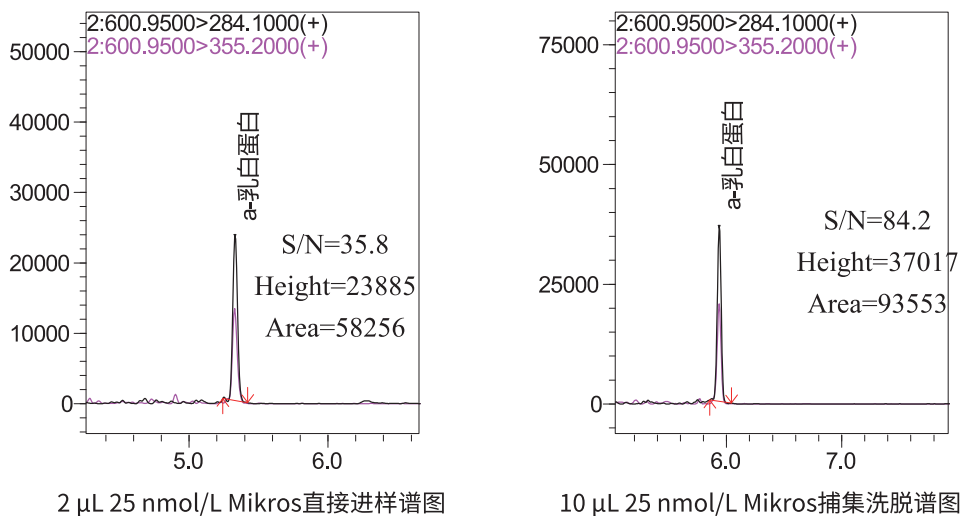


图3 Mikros 直接和捕集洗脱系统对比色谱图

2.3 线性范围

采用 Mikros 捕集洗脱系统建立 α -乳白蛋白工作曲线，按 1.1 中的分析条件进行分析检测，5、10、25、50、200 nmol/L 外标法制作校准曲线，各级别线性回归的准确度、信噪比、定量限如表 4 所示。线性良好，线性方程、相关系数见图 4。

表4 α -乳白蛋白校准曲线准确度和定量限

Data#	数据文件名	浓度 (nmol)	标准浓度	精确度%	高度	S/N	定量限
1	mikros-trap-2 min 上样_a 5nmol b	4.714	5	94.3	5,087	10.51	4.49
2	mikros-trap-2 min 上样_a 10nmol	9.403	10	94.0	11,355	37.25	2.52
3	mikros-trap-2 min 上样_a 25nmol	28.975	25	115.9	37,017	84.23	3.44
4	mikros-trap-2 min 上样_a 50nmol	48.217	50	96.4	62,955	72.26	6.67
5	mikros-trap-2 min 上样_a 200nmol	198.690	200	99.3	275,886	390.78	5.08

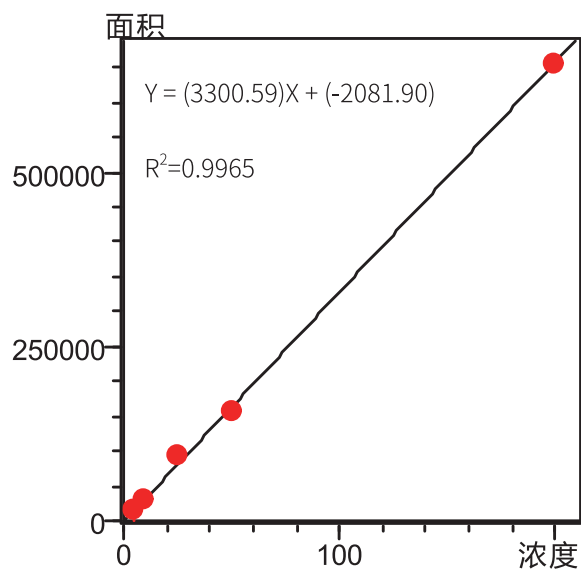


图4 α -乳白蛋白的线性方程及相关系数

2.4 重复性考察

5 nmol/L 和 50 nmol/L 标准溶液连续进样分析 6 次，计算保留时间及峰面积的相对标准偏差 (%RSD)。结果如表 5 所示， α -乳白蛋白特异肽段的保留时间及峰面积 RSD 均处于合理范围。

表5 重复性考察结果 (n=6)

化合物	保留时间RSD (%)		峰面积RSD (%)	
	5nmol	50nmol	5 nmol	50 nmol
α -乳白蛋白	0.06	0.05	6.64	9.92

2.5 实际样品检测

多份乳糖辅料样品，按照 1.5 所述步骤提取，1.1 中的分析条件进行分析检测。所有样品中均检出 α -乳白蛋白特异肽段。实际样品的典型色谱图见图 5，检测结果见表 6。

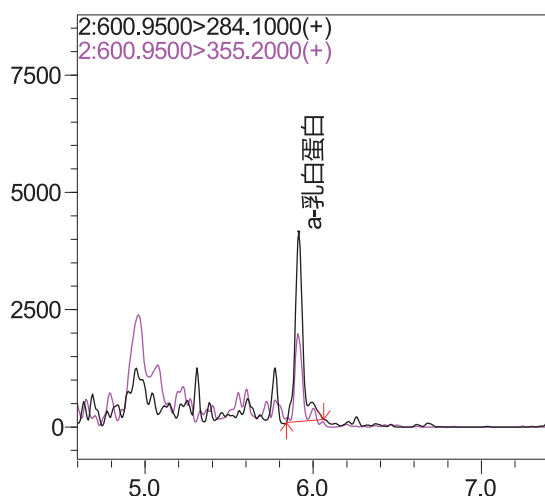


图5 实际样品检测典型谱图

表6 乳糖辅料实际样品检测结果

样品编号	含量 (mg/kg)	样品编号	含量 (mg/kg)
1-1	52.59	4-2	24.86
1-2	49.01	5-1	24.77
2-1	43.13	5-2	26.19
2-2	43.86	6-1	27.74
3-1	43.59	6-2	32.36
3-2	37.23	7-1	37.83
4-1	33.26	7-2	47.81

结论

本实验使用岛津微流量捕集洗脱系统建立了乳糖辅料中 α -乳白蛋白的定量分析方法，10 μ L 进样量下， α -乳白蛋白定量肽段在 5~200 nmol/L 浓度范围内的标准曲线相关系数良好 ($R=0.9965$)，标线各点的准确度范围在 94.0~115.9%；5 和 50nmol/L 浓度的标准曲线点平行测定 6 次，保留时间的 RSD 不大于 0.06%，峰面积不大于 RSD9.92%。实际样品均检出 α -乳白蛋白，含量在 24.86-52.59 mg/kg。由于实际样品中 α -乳白蛋白含量极低，必须采用 Mikros 捕集系统来提升仪器的灵敏度。该方法可供药检实验室参考。