

Orbitrap高分辨质谱助力百日咳疫苗中TCT的检测

龙珍 陈兵

赛默飞世尔科技(中国)有限公司

关键词

TCT 百日咳 PRM 超高效液相色谱仪 Orbitrap高分辨质谱仪

引言

百日咳杆菌气管细胞毒素简称TCT(tracheal cytotoxin), 是一种引起百日破疫苗(DTP, diphtheria tetanus pertussis)不良反应的毒性糖肽。TCT最早被Goldman等人从百日咳杆菌培养液中发现¹⁻³。呼吸道上皮细胞培养试验表明⁴, 浓度为1 $\mu\text{mol/L}$ 的TCT 即可摧毁纤毛细胞群, 产生类似百日咳的症状。由于TCT毒性较大, 尽管百日咳疫苗的生产过程中有超滤、柱沉析(组分百日咳)等步骤, 理论上足以去除比百日咳抗原分子量更小的TCT, 百日咳相关的疫苗成品中仍要求检测残留TCT。如英国药典, 要求TCT限量不超过2 pmol/剂。Goldman等人建立的TCT液相检测方法², 虽然可实现TCT的检测, 但该方法的一些缺陷导致其难以被疫苗企业使用: 第一, 该方法灵敏度较低、难以满足药典检测需求; 第二, 该方法需要较为复杂的衍生过程, 检测十分繁琐; 第三, TCT的标准品极其珍贵但该方法对标品的需求量较大。龙珍等人用液相色谱串联三重四极杆质谱建立了TCT的高灵敏度检测方法⁵, 该方法可实现TCT的高灵敏度定量检测, 但受限于检测器的分辨率, 难以实现高准确度的定性筛查。中等分辨率的质谱, 如Q-TOF可实现TCT的筛查, 但受仪器灵敏度、稳定性和复杂性的限制, 用于百日咳的生产过程监控较为困难。Orbitrap高分辨质谱⁶具有三重四极杆质谱的灵敏度, 同时还具备比Q-TOF更高的分辨率, 可有效实现TCT的高灵敏度、高准确性检测, 排除假阳性结果, 实现TCT定性、和定量的同时分析。此外, Orbitrap还具有超高稳定性, 无需频繁校正和维护, 对操作人员的要求较低, 易于生产过程监控。

本文以Orbitrap高分辨质谱为平台, 采用平行反应监测模式 (PRM需要加上PRM的英文全称) 开发TCT的高灵敏度、高准确度的定性、定量同时监测方法, 并将该方法用于多种百日咳样品中TCT的检测。由于PRM检测模式可获得精确的产

物离子全谱, 可在没有TCT对照品的情况下, 利用标准谱图实现样品中TCT筛查, 从而解决TCT对照品缺乏的问题。

2. 实验部分

2.1 样品

TCT对照品(浓度分别为369-0.72 ng/L), 厂家1-5百日咳相关样品。

2.2 仪器及试剂

质谱仪器: Q Exactive focus (赛默飞世尔科技, 美国);

色谱仪器: Vanquish Flex液相色谱系统 (赛默飞世尔科技, 美国);

色谱柱: BioC18, 3 μm , 2.1 \times 150 mm (公司名称);

试剂: 二次去离子水, 乙腈(质谱级), 甲酸(质谱级)。

2.3 仪器方法

色谱分析条件: 具体见表1;

表1 TCT检测色谱条件

流动相	A相(%) : 0.1%甲酸-水;	B相(%) : 0.1%甲酸-乙腈
流速 (ml/min)	0.3	
进样体积 (μL)	10	
柱温 ($^{\circ}\text{C}$)	50	
色谱梯度	时间 (min)	B相浓度 (%)
	-4	3
	0	3
	3	20
	3.1	80
	5	80

质谱分析条件：具体见表2；

表2 TCT定量分析质谱条件

喷雾电压	3.5 kV
离子源:	ESI+
S-lens	55%
碰撞能量 NCE	22%
鞘气流速:	35 (arb)
辅助气流速:	10 (arb)
采集模式	PRM
一级质量范围; 分辨率	m/z 300-1200; 70,000
二级质量范围; 分辨率	m/z 100-1000; 35,000
毛细管加热温度	320 °C

2.3 数据分析方法

Thermo Xcalibur Quan Browser定量浏览器

3. 结果与讨论

3.1 分子量的确定

首先以70,000分辨率在m/z 300-1200范围内获取TCT的一级质谱总离子流图，如图1a所示。提取色谱峰对应的质谱图，如图1b所示。将质谱信息与文献对比，可知m/z 922.38719是TCT的 $[M+H]^+$ 峰，与理论m/z 922.3888相差-1.75 ppm。

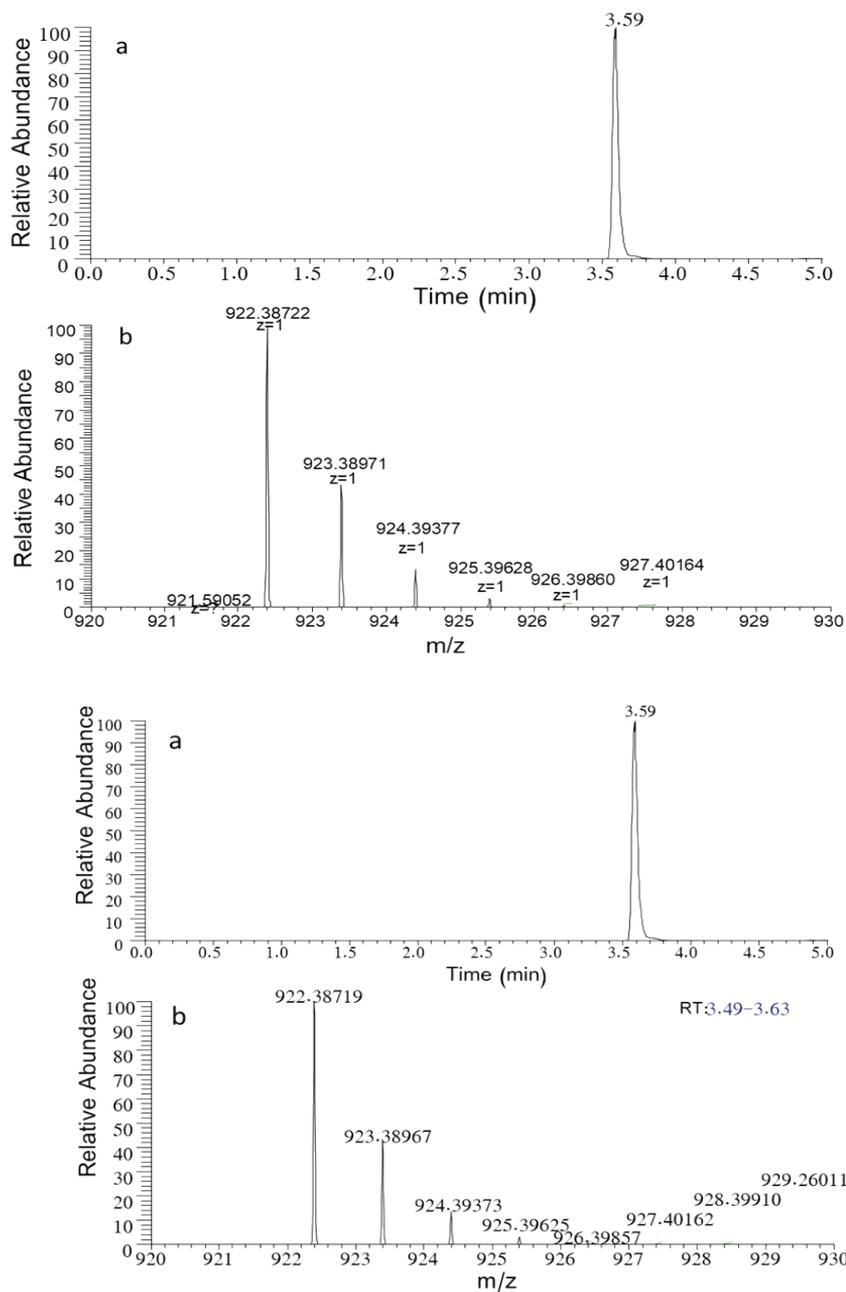


图1 TCT一级质谱总离子流图 (a) 和质谱图 (b)

3.2 PRM定性分析TCT

SPRM模式通常采集两对离子对作为目标化合物定量、定性的依据。但SMRM模式一级和二级均为低分辨检测，因此面对复

杂样品时容易出现假阳性。PRM模式以特定前体离子为目标，获取该目标 m/z 的所有高分辨、精确质量产物离子，从质量准确度和产物离子全谱信息两个维度减少复杂样品带来的假阳性干扰，即使没有对照品仍可实现样品中TCT的筛查。

为了实现该目标，首先对TCT的碰撞能量进行优化，获取了碰撞能为30-15条件下的TCT二级谱图。其中，碰撞能30、25、22和15的谱图如图2所示。较高的碰撞能导致高质荷比的产物离子响应较低，如 m/z 为719.3079的产物离子在碰撞能为30的谱图中响应较低。较低的碰撞能导致产物离子种类较少，如碰撞能为15的谱图中， m/z 719.3079以下的产物离子较少。为了尽可能获得丰富的产物离子碎片，同时与已有的SMRM方法匹配（既响应最高的产物离子分别为719.3和302.1），选择碰撞能为22。

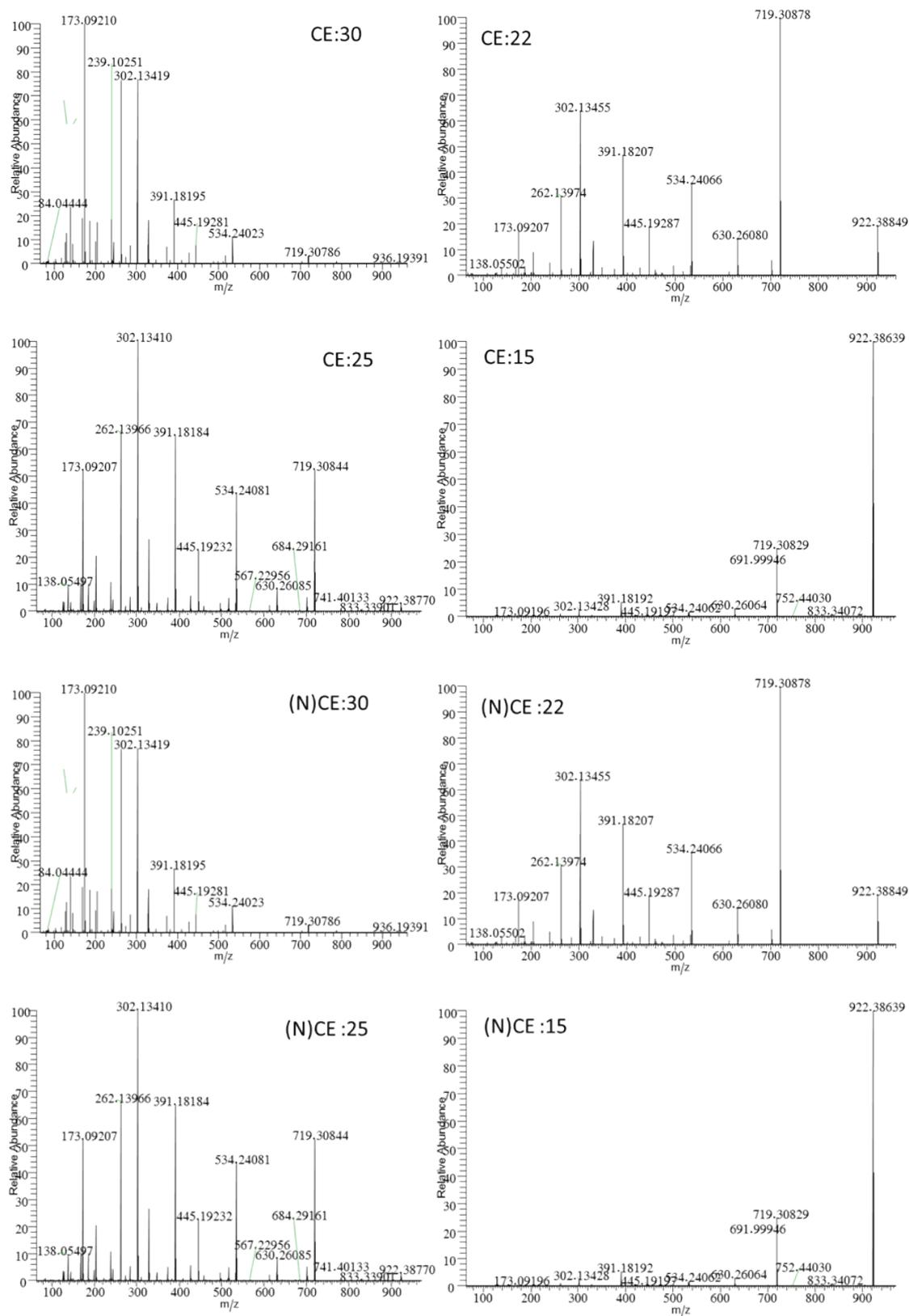


图2 不同碰撞能获得的TCT二级质谱图

将本方法用于厂家1百日咳疫苗样品定性分析，如图3所示。以10 ppm做为精确提取窗口，提取m/z 719.3079的色谱峰，可观察到两个信号并且两个色谱峰均包含二级碎片m/z 719.3079和302.1343。由于m/z 719.3和302.1是TCT的MRM检测方法定量、定性通道⁵，因此若以该方法对本样品进行检测，无对照品难以判断TCT出峰位置。以Orbitrap的PRM模式检测该样品，可通过对比PRM谱图将保留时间为2.0-2.1 min的信号排除。该信号峰不含TCT除m/z 719.3079和302.1345以外的其它产物离子如m/z 391.1821和534.2404等。

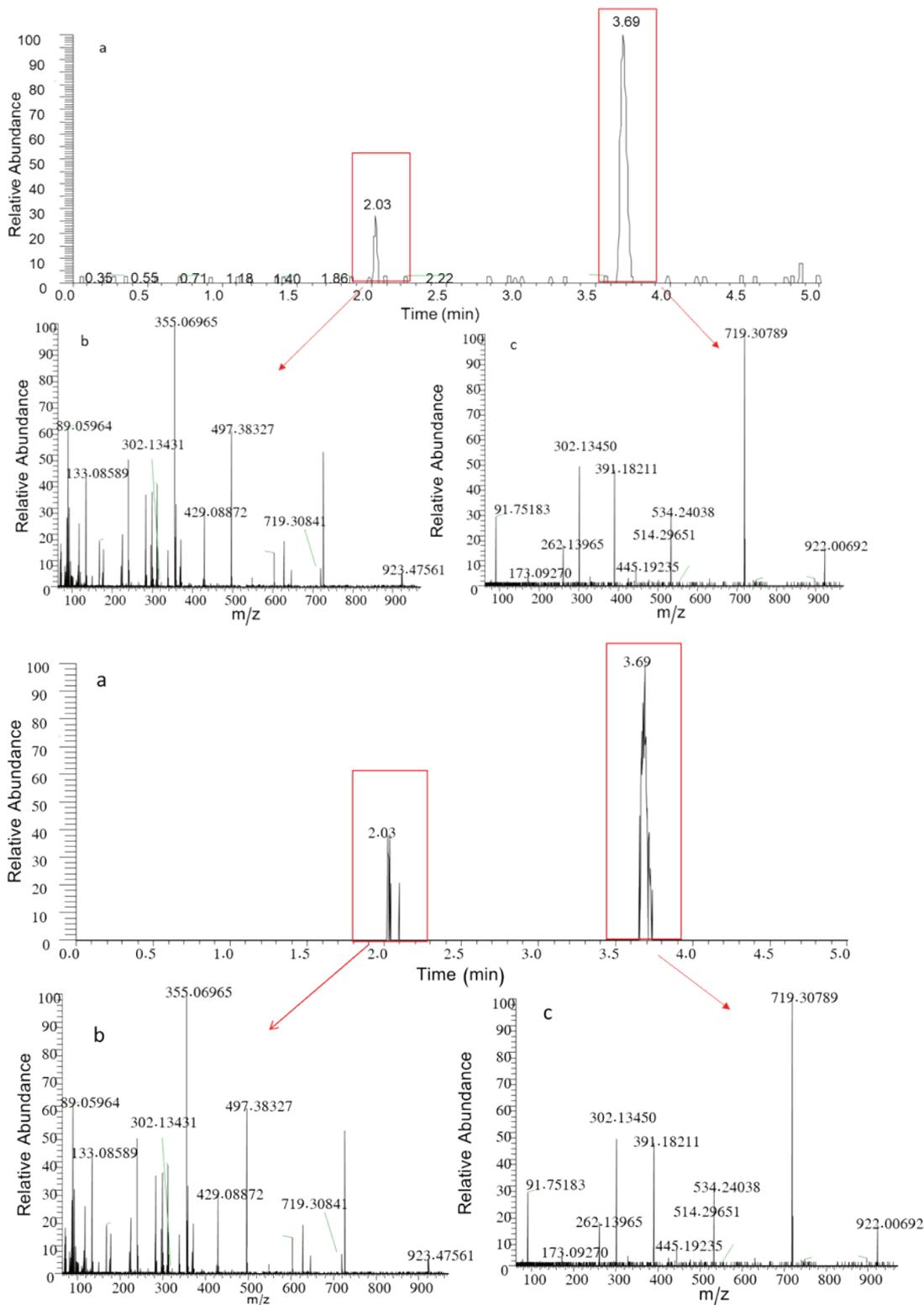


图3 某含百日咳疫苗样品的一级色谱质谱图 (a)、保留时间为2.0-2.2 min (b) 和保留时间为3.6-3.8 min (c) 的PRM质谱图。

利用PRM模式提供的高质量精度二级质谱图可有效排除TCT检测的假阳性。如图4所示，以10 ppm做为精确提取窗口，提取m/z 719.3079的色谱峰，可在2.0-2.2 min之间检测到包含二级碎片m/z 719.3079和302.1343的色谱峰。由于m/z 719.3和302.1是TCT的MRM检测方法定量、定性通道⁵，因此若以该方法对本样品进行检测，容易误判为TCT检出。以Orbitrap的PRM模式检测该样品，可通过对比PRM谱图将该假阳性结果排除。该信号峰不含TCT除m/z 719.3079和302.1345以外的其它

它产物离子如m/z 391.1821和534.2404等。

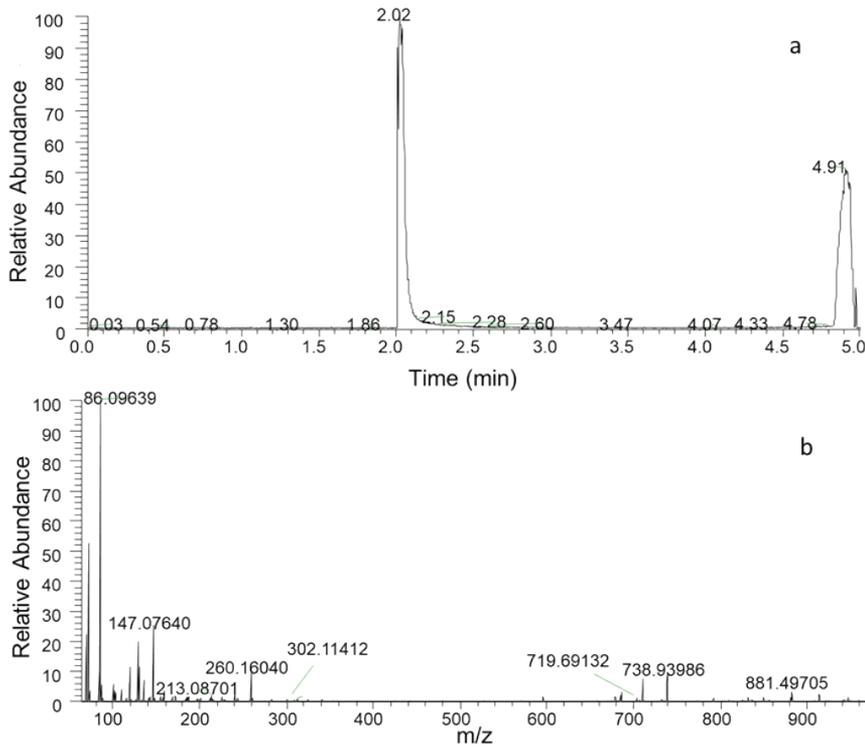


图4 某百日咳样品一级质谱色谱图 (a) 和保留时间为2.0-2.5 min的PRM质谱图 (b)。

3.3 PRM定量分析百日咳样品中TCT

PRM不仅是有利的定性筛查手段，也是一种高灵敏的定量方法。以m/z 922.3872为前体离子，m/z 719.3083为产物离子，建立TCT定量方法，结果如图5所示。线性范围从2.88-369 ng/L，LOQ为0.72 ng/L。该方法灵敏度比MRM方法5高4倍，且具有更好的抗假阳性能力。将该方法用于5个厂家的百白破疫苗样品分析（表3），疫苗样品中无TCT检出。

表3 不同厂家百日咳疫苗中TCT检测

样品	TCT含量	样品	TCT含量
厂家1共纯化百日咳疫苗	未检出	厂家3组分百日咳疫苗	未检出
厂家2共纯化百日咳疫苗	未检出	厂家4组分百日咳疫苗	未检出
厂家3共纯化百日咳疫苗	未检出		

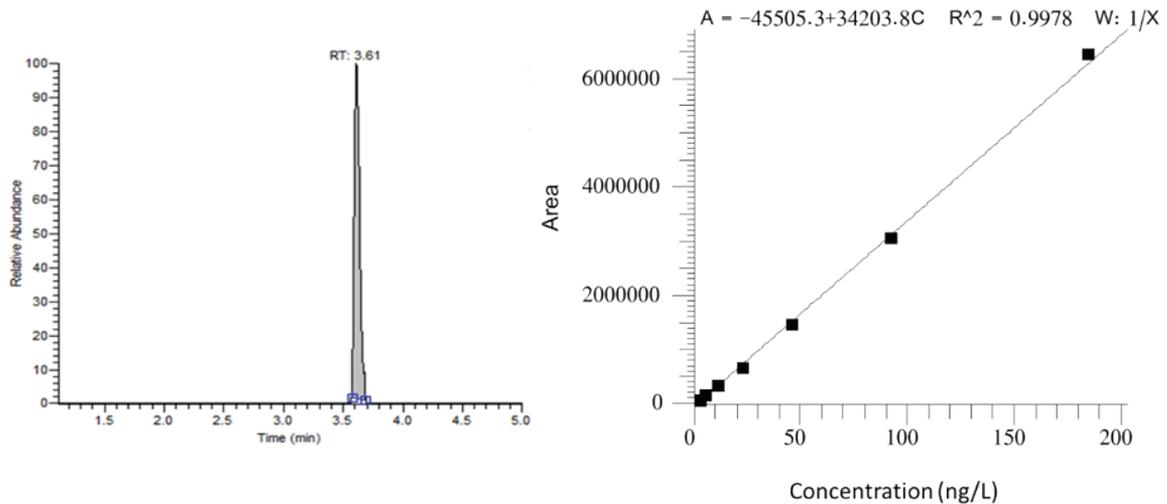


图5 PRM模式定量TCT的线性曲线和浓度为2.88 ng/L的TCT谱图。

结论

本文开发了一种以Orbitrap高分辨质谱为平台的PRM定性筛查和定量检测百日咳样品中TCT的方法，该方法具有比已报道的方法更高的灵敏度、更宽的线性范围。由于PRM模式采集高质量准确度的所有产物离子，具有高质量准确度和产物离子全谱双维度抗假阳性功能，可实现无TCT对照品时百日咳样品的高准确性TCT筛查。

参考文献

1. Adin, D. M.; Engle, J. T.; Goldman, W. E.; Mcfall-Ngai, M. J.; Stabb, E. V., Mutations in ampG and Lytic Transglycosylase Genes Affect the Net Release of Peptidoglycan Monomers from *Vibrio fischeri*. *Journal of Bacteriology* 2009, 191, 2012.
2. Adin, D. M.; Engle, J. T.; Goldman, W. E.; Mcfall-Ngai, M. J.; Stabb, E. V., TCT紫外衍生检测灵敏度。Mutations in ampG and Lytic Transglycosylase Genes Affect the Net Release of Peptidoglycan Monomers from *Vibrio fischeri*. *Journal of Bacteriology* 2009, 191, 2012.
3. Cookson, B. T.; Cho, H. L.; Herwaldt, L. A.; Goldman, W. E., Biological activities and chemical composition of purified tracheal cytotoxin of *Bordetella pertussis*. *Infection & Immunity* 1989, 57, 2223.
4. Cookson, B. T.; Cho, H. L.; Herwaldt, L. A.; Goldman, W. E., Biological activities and chemical composition of purified tracheal cytotoxin of *Bordetella pertussis*. *Infection and Immunity* 1989, 57, 2223-2229.
5. Long, Z.; Wei, C.; Guo, Z.; Ma, X.; Li, Y.; Yao, J.; Ji, F.; Li, C.; Huang, T., Determination of tracheal cytotoxin in pertussis and diphtheria tetanus acellular pertussis vaccines using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Chinese Journal of Chromatography* 2019, 37, 155-161.
6. Hu, Q.; Noll, R. J.; Li, H.; Makarov, A.; Hardman, M.; Graham Cooks, R., The Orbitrap: a new mass spectrometer. *Journal of Mass Spectrometry* 2005, 40, 430-443.



赛默飞
官方微信

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

Thermo Fisher
S C I E N T I F I C