

LC-MS/MS 法定量分析通过发酵生产的寡糖中 IPTG 残留

LCMSMS-716

摘要: 本文采用岛津高效液相色谱联合三重四极杆质谱,建立了测定通过发酵生产的寡糖中 IPTG 含量的方法。该方法中, IPTG 在 0.5~100 ng/mL 范围内线性良好,相关系数为 0.9998,各校准点准确度在 95.1~106.1% 之间。精密实验中,低中高三个浓度点的 IPTG 的保留时间 RSD% 在 0.05~0.21 之间,峰面积 RSD% 在 1.02~4.51 之间。回收率实验中, IPTG 浓度为 0.5、5 和 50 ng/mL 的样品加标溶液平均回收率在 95.4~119.8% 之间, RSD% 在 1.55~2.31 之间。实验结果表明,该方法能快速准确地测定 IPTG 的含量。

关键词: 高效液相色谱 三重四极杆质谱 寡糖 IPTG

IPTG 的中文名叫异丙基-β-D-硫代半乳糖,是 β-半乳糖苷酶的活性诱导物质。基于这个特性,当 pUC 系列的载体 DNA (或其他带有 lacZ 基因载体 DNA) 以 lacZ 缺失细胞为宿主进行转化时、或用 M13 噬菌体的载体 DNA 进行转染时,由于 β-半乳糖苷酶的 α-互补性,如果在平板培养基中加入 X-Gal 和 IPTG,可以根据是否呈现白色菌落(或噬菌斑)而方便地挑选出基因重组体。此外,它还可以作为具有 lac 或 tac 等启动子的表达载体的表达诱导物使用。现有技术中, IPTG 作为一种分子生物学试剂,常用于蓝白斑筛选及 IPTG 诱导的细菌内的蛋白表达等。基因工程技术中,采用 IPTG 作为诱导剂,可促进目的蛋白的大量表达。但 IPTG 价格昂贵,使用量

过多时有毒性,并且提高了工业生产成本。

IPTG 是一种半硫代的化合物,没有紫外可见光吸收,无法直接采用紫外检测器检测。目前最常用的检测方法是衍生化联合荧光检测器检测,如常用的荧光衍生试剂有邻苯二甲醛和 N-马来酰亚胺。但是这种检测法费时费力,选择性差,而且存在衍生不完全的可能。因此,开发一种 IPTG 含量的检测方法,以实现生化样品中 IPTG 含量的准确测定,对控制药物质量安全性具有重要意义。

本实验使用高效液相色谱联合三重四极杆质谱建立了寡糖中 IPTG 含量测定方法,该方法灵敏度高,分析速度快,准确度高。

■ 实验部分

1.1 仪器

高效液相色谱联合三重四极杆质谱,配置信息如下:

系统控制器: CBM-20A

输液泵: LC-30AD×2

质谱仪: LCMS-8050

自动进样器: SIL-30AC

脱气机: DGU-20A 5R

色谱工作站: Labsolutions Ver. 5.99

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱: ACQUITY UPLC HSS T3(2.1 mm I.D.×100 mm L.,1.8 μm)

流动相: A-0.1% 甲酸水 +5 mM 乙酸铵溶液; B- 甲醇

进样体积: 10 μL

流速: 0.4 mL/min

洗脱方式: 梯度洗脱, B 相起始浓度为 5%, 时间程序如表 1 所示。

柱温: 40°C

洗针液: 甲醇 / 水 =1:1 (v:v)

表 1 梯度洗脱时间程序

时间 (min)	单元	处理命令	值
1.00	泵	B Conc	5
6.00	泵	B Conc	95
7.00	泵	B Conc	95
8.00	泵	B Conc	5
10.00	控制器	STOP	

质谱条件

离子化模式: ESI, 正离子模式

雾化气流速: 3.0 L/min

接口温度: 300 °C

DL 温度: 250 °C

碰撞气: 氦气

加热模块温度: 400°C

干燥气流速: 10.0 L/min

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

接口电压: 4 kV

MRM 参数: 见表 2

表 2 MRM 参数

中文名称	缩写	CAS 号	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
异丙基-β-D-硫代半乳糖苷	IPTG	367-93-1	256.1	163.1*	-15.0	-13	-15
				145.1	-15.0	-18	-15
				91.0	-15.0	-28	-15

* 代表定量离子对。

1.3 标准工作溶液配制

称量 1 mg IPTG 标准品, 加超纯水溶解, 配制成 1 mg/mL 标准储备溶液。用水逐级稀释, 配制成浓度分别为 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100 ng/mL 的标准工作溶液, 上机测试。

1.4 样品溶液配制

分别称量 1 mg 样品, 加超纯水溶解, 配制成 1 mg/mL 样品溶液, 上机测试。

■ 结果与讨论

2.1 标准溶液 MRM 色谱图

按照 1.2 分析条件测定, 0.5 ng/mL IPTG 标准溶液响应如图 1 所示, IPTG 的 S/N 为 23.22, 灵敏度良好。

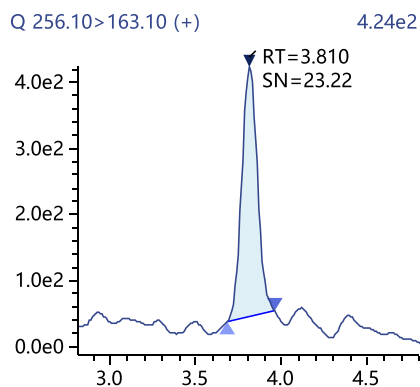


图 1 标准溶液 MRM 色谱图 (0.5 ng/mL)

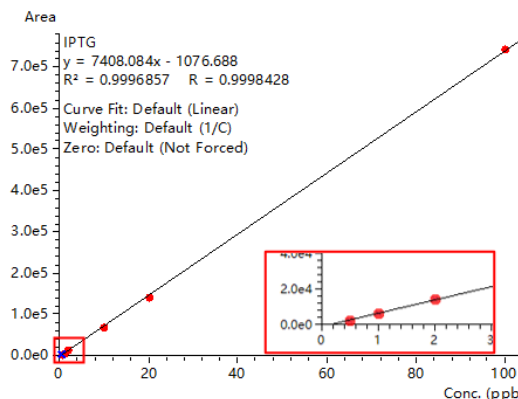


图 2 IPTG 校准曲线

2.2 校准曲线

按照 1.2 分析条件测定，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，采用外标法建立线性校准曲线，结果如图 2 所示，IPTG 在 0.5~100 ng/mL 线性浓度范围内，线性相关性良好，相关系数为 0.9998，各校准点准确度在 95.1~106.1% 之间。

2.3 精密度实验

按照 1.2 分析条件测定，选择浓度为 0.5 ng/mL, 2 ng/mL 和 50 ng/mL 的标准溶液连续进样 6 针考察仪器精密度。结果显示 IPTG 的保留时间 RSD% 在 0.05~0.21 之间，峰面积 RSD% 在 1.02~4.51 之间，见表 3。实验结果表明，该分析方法具有良好的精密度。

表 3 保留时间和峰面积精密度结果 (n=6)

名称	低浓度 (0.5 ng/mL)		中浓度 (2 ng/mL)		高浓度 (50 ng/mL)	
	保留时间 (RSD%)	峰面积 (RSD%)	保留时间 (RSD%)	峰面积 (RSD%)	保留时间 (RSD%)	峰面积 (RSD%)
IPTG	0.21	4.51	0.11	2.29	0.05	1.02

2.4 实际样品分析

将 2 个寡糖样品按 1.4 配制样品溶液，用 1.2 分析条件测定，结果如图 3 和图 4 所示，所测样品中均未检出 IPTG。

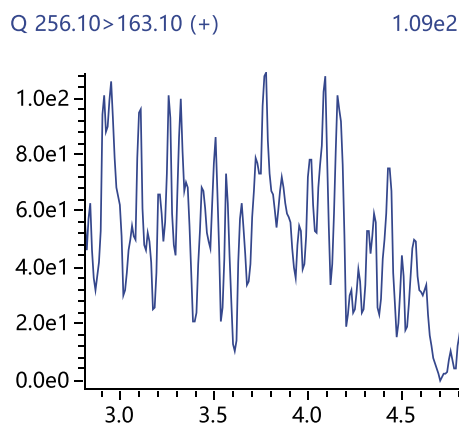


图 3 样品 1 MRM 色谱图

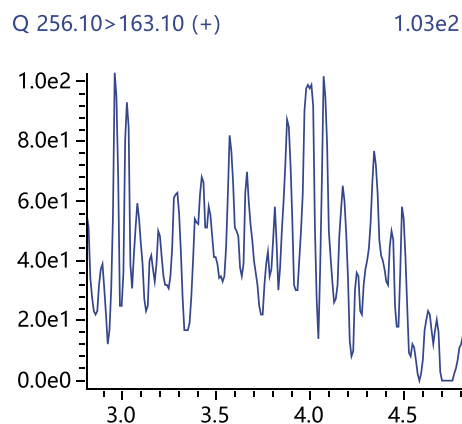


图 4 样品 2 MRM 色谱图

2.5 回收率

向浓度为 1 mg/mL 的样品溶液中添加 IPTG 标准品溶液，配制成 IPTG 浓度为 0.5、5 和 50 ng/mL 的样品加标溶液，每个水平重复测定 3 次，质控品的准确度和精密度结果如表 4 所示，平均回收率在 95.4~119.8% 之间，RSD% 在 1.55~2.31 之间。在分析过程中为了避免高浓度样品进入质谱，在软件中设置阀切换程序，将 4.5 min 以后的高浓度组分切入废液。

表 4 方法回收率结果 (n=3)

理论浓度 (ng/mL)	平均回收率 %	RSD%
0.5	119.8	1.77
5	95.4	2.31
50	96.4	1.55

■ 结论

本实验使用岛津高效液相色谱串联三重四极杆质谱，建立了定量分析通过发酵生产的寡糖中 IPTG 含量的方法。IPTG 在 0.5~100 ng/mL 范围内线性良好，相关系数为 0.9998，精密度实验中，低中高三个浓度点的 IPTG 的保留时间 RSD% 在 0.05~0.21 之间，峰面积 RSD% 在 1.02~4.51 之间。回收率实验中，IPTG 浓度为 0.5、5 和 50 ng/mL 的样品加标溶液平均回收率在 95.4~119.8% 之间，RSD% 在 1.55~2.31 之间。实验结果表明，该方法灵敏度高，分析速度快，准确性好，可用于寡糖中 IPTG 的残留分析。

岛津应用云

