

LCMSMS 检测重组胶原蛋白中氨苄西林抗生素残留

LCMSMS-574

摘要： 本文建立了一种使用岛津三重四极杆液质联用仪检测重组胶原蛋白中氨苄西林抗生素残留的方法。样品经乙腈沉淀蛋白，离心滤过后上机分析。采用外标法定量，在 0.05~100 ng/mL 范围内，相关系数大于 0.9999。三个浓度下保留时间和峰面积的相对标准偏差 (RSD) 分别在 0.05~0.15 % 和 0.97~4.26 % 之间。该方法灵敏可靠，氨苄西林定量限为 0.05 ng/mL；三个浓度样品加标回收率在 95.9~100.4% 之间，每个浓度平行处理三次，测试结果的 RSD 在 1.11~4.73% 之间；可为重组胶原蛋白中氨苄西林抗生素残留测定提供参考。

关键词： 重组胶原蛋白 氨苄西林 抗生素残留 三重四极杆液质联用仪

重组胶原蛋白是指采用重组 DNA 技术，对编码所需人胶原蛋白质的基因进行遗传操作和（或）修饰，利用质粒或病毒载体将目的基因带入适当的宿主细胞（细菌、酵母或其它真核细胞等）中，表达并翻译成胶原蛋白或类似胶原蛋白的多肽，经过提取和纯化等步骤制备而成。

重组人源胶原蛋白具有与人体胶原蛋白相同的氨基酸序列和稳固的三螺旋结构，同时在此基础上进行优化，提高了亲水性和活性，具有亲水性好、安全性高、稳定性高、机械强度和细胞粘附活性高等优点，在生物医用

材料、美容化妆品、食品保健等领域有着广泛的应用前景。

重组人源胶原蛋白的生产一般采用生物发酵的方式，而该过程中会使用到氨苄西林等抗生素来保持宿主细胞培养时良好的生长状态。由于在培养过程中使用了氨苄西林，故需要对重组胶原蛋白终产品中氨苄西林残留量进行检测和监控，以保证产品安全性。

本文建立了一种采用三重四极杆液质联用仪检测重组胶原蛋白中氨苄西林抗生素残留量的分析方法。样品经乙腈沉淀蛋白后直接进样分析，前处理简单、分析速度快、灵敏度高，可供相关检测人员参考。

■ 实验部分

1.1 仪器

本实验采用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用系统。

具体配置为：

系统控制器：CBM-20A

脱气机：DGU-20A₅

输液泵：LC-30AD×2

自动进样器：SIL-30AC

柱温箱：CTO-20AC

质谱仪：LCMS-8050

色谱工作站：LabSolutions Ver.5.99

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱：Shimadzu Shim-pack Velox SP-C18 100 mm x 2.1 mm I.D., 1.8 μm；
P/N: 227-32001-03；岛津（上海）实验器材有限公司

流动相：A-0.1% 甲酸水溶液；B- 乙腈

流速：0.4 mL/min

柱温：40°C

进样体积：1 μL

洗针方式：内外壁同时清洗

洗针液 R1&R3：甲醇 / 乙腈 / 异丙醇 / 水 =
1/1/1/1 (v/v, 含 0.5% 甲酸)

洗针液 R0：甲醇 / 水 =1/1 (v/v)

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 5%，时间程序见表 1。

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
2.00	Pumps	Pump B Conc.	30
2.50	Pumps	Pump B Conc.	90
4.50	Pumps	Pump B Conc.	90
4.51	Pumps	Pump B Conc.	5
7.00	Controller	Stop	

质谱条件

离子化模式：ESI, 正离子模式	加热气流速：10 L/min
雾化气流速：3 L/min	干燥气流速：10 L/min
加热模块温度：400°C	碰撞气：氩气 270 kPa
接口温度：300°C	扫描模式：多反应监测 (MRM)
D L 温度：250°C	MRM 参数：见表 2

表 2 MRM 参数

No.	中文名称	英文名称	CAS#	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
1	氨苄西林	Ampicillin	69-53-4	350.05	106.10* 192.05	-10.0	-20.0 -15.0	-21.0 -13.0

* 代表定量离子对。

1.3 标准溶液制备

以 80% 乙腈水配制标准贮备液 (500 µg/mL)，以 80% 乙腈水逐级稀释为 0.05、0.1、0.2、0.5、1、2、5、10、20、50 和 100 ng/mL 共 11 个标准系列工作溶液，待测。

1.4 样品前处理

准确称取重组胶原蛋白固体样品，加入超纯水溶解完全，配制为 1 mg/mL 的样品溶液。取 100 µL 样品溶液，加入 400 µL 乙腈，涡旋混匀，14000 rpm 离心 5 min，上机分析。

■ 结果与讨论

2.1 专属性

溶剂空白与标准溶液 MRM 重叠谱图显示，目标峰保留时间处，未见明显干扰。

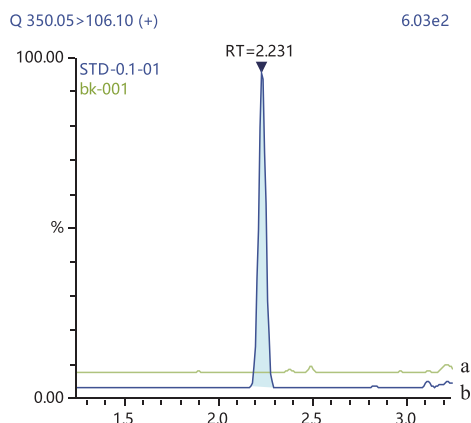


图 1 溶剂空白 (a) 和标准溶液 (b, 0.1 ng/mL) MRM 重叠色谱图

2.2 线性关系

按照 1.3 配制 11 个不同浓度的标准系列溶液，按照 1.2 中的分析条件进行测定。以峰面积为纵坐标，以浓度为横坐标，外标法绘制标准曲线。各化合物标准曲线见图 2，线性方程、相关系数和定量限见表 3。

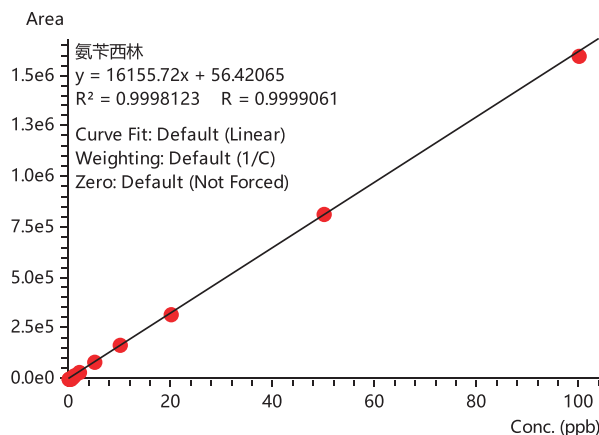


图 2 标准曲线

表 3 线性关系和定量限 (权重: 1/C)

名称	校准曲线	线性范围 (ng/mL)	准确度 (%)	相关系数 r	定量限 (ng/mL)	定量限 S/N
氨苄西林	Y=16155.72X+56.4206	0.05~100	87.9~105.1	0.9999	0.05	41.77

2.3 精密度实验

对三个浓度的标准溶液连续 6 次进样，考察仪器的精密度，保留时间和峰面积的精密度结果如表 4 所示。三个浓度标准品的保留时间和峰面积的 RSD 分别在 0.05~0.15% 和 0.97~4.26% 之间，仪器精密度良好。

表 4 精密度结果 (n=6)

名称	RSD% (0.2 ng/mL)		RSD% (2 ng/mL)		RSD% (20 ng/mL)	
	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area
氨苄西林	0.15	4.26	0.05	2.48	0.11	0.97

2.4 加标回收实验

使用本方法检测了两份重组胶原蛋白样品，在阴性样品中添加标准溶液，配制为三个不同浓度的加标样品，每个浓度平行制备三份，按照 1.4 处理后上机分析，样品 MRM 谱图见图 3，样品检测结果和加标回收结果见表 5。三个浓度加标回收率在 95.9~100.4% 之间，测试结果的 RSD 在 1.11~4.73% 之间，方法可靠。

表 5 样品加标回收率 (n=3)

化合物名称	样品 1 含量 µg/g	样品 2 含量 µg/g	1 µg/g		10 µg/g		100 µg/g	
			回收率 /%	RSD /%	回收率 /%	RSD /%	回收率 /%	RSD /%
氨苄西林	N.D.	0.325	96.5	4.73	100.4	2.76	95.9	1.11

注：N.D. 表示未检出。

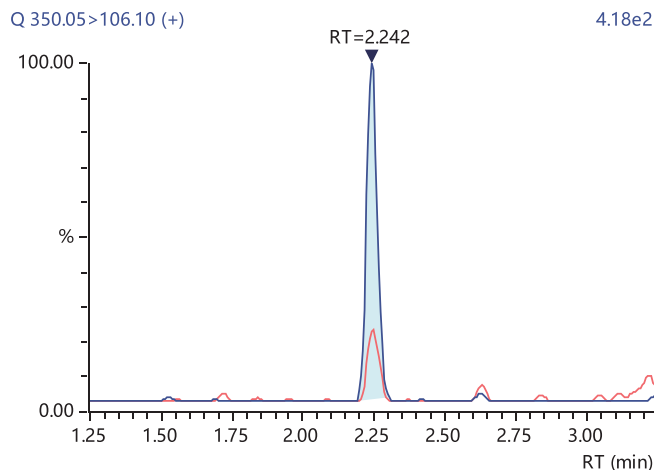


图3 样品 2 MRM 谱图

2.5 残留考察

高浓度标准样品 (100 ng/mL) 分析完成后, 进样分析溶剂空白, 分析结果与定量下限 (0.05 ng/mL) 比对, 残留考察结果表明, 氨苄西林检测通道中无干扰。

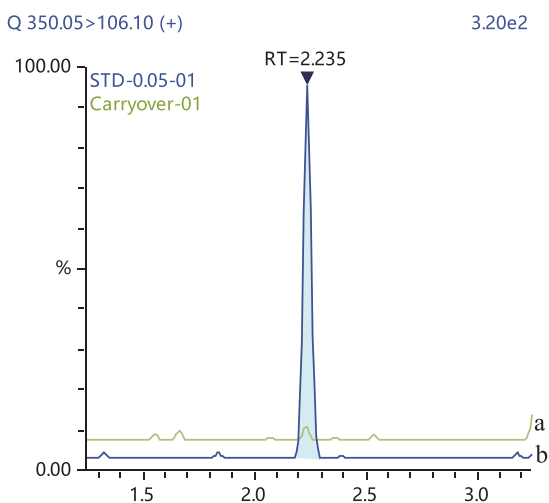


图4 残留考察溶剂空白 (a) 和定量下限 (b, 0.05 ng/mL) MRM 重叠图

■ 结论

本文建立了一种使用岛津三重四极杆液质联用仪 LCMS-8050 测定重组胶原蛋白中氨苄西林抗生素残留的方法。本方法中的重组胶原蛋白主要指人的胶原蛋白基因重组产物, 基于非人胶原蛋白基因重组胶原蛋白或类胶原蛋白产物中氨苄西林抗生素残留量检测, 也可参考本方法进行。本方法快速、灵敏、准确, 适用于重组胶原蛋白产品中氨苄西林抗生素残留的检测和监控。

岛津应用云

