

中图分类号: R917; R927 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2024)16-0086-04
doi: 10.3969/j.issn.1006-4931.2024.16.019



超高效液相色谱串联质谱法检测人促红素注射剂中2种抗生素残留

唐娜, 苏超男, 陈统华, 肖一桐, 王嫦鹤, 徐长根[△]

(陕西省食品药品检验研究院, 陕西 西安 710065)

摘要:目的 建立检测人促红素注射剂中氨苄西林和博来霉素残留的超高效液相色谱串联质谱(UPLC-MS/MS)法。方法 色谱柱为 Waters Cortecs T3 柱(100 mm × 2.1 mm, 2.7 μm); 流动相为 0.1% 甲酸水溶液 - [乙腈 - 甲醇(95:5, V/V)], 梯度洗脱; 流速为 0.2 mL/min; 柱温为 40 °C; 进样量为 5 μL。采用电喷雾离子源正离子模式和多反应监测扫描模式。结果 氨苄西林和博来霉素质量浓度分别在 19.38~484.5 ng/mL($r=0.9979, n=5$)和 21.26~212.6 ng/mL($r=0.9988, n=5$)范围内与峰面积线性关系良好, 检测限分别为 0.00969, 10.63 ng/mL, 定量限分别为 0.0969, 21.26 ng/mL; 精密性、稳定性试验结果的 RSD 均小于 4.0%; 平均加样回收率分别为 102.11% 和 101.77%, RSD 分别为 7.46% 和 13.35%; 基质效应均不明显(分别为 95.03% 和 84.51%)。9 家国内生产企业和 1 家国外生产企业的 39 批人促红素注射剂均未检出氨苄西林和博来霉素。结论 所建立的方法操作简单、检测灵敏, 结果准确, 可用于人促红素注射剂中氨苄西林和博来霉素残留的检测。

关键词:人促红素注射液; 注射用人促红素; 超高效液相色谱串联质谱法; 氨苄西林; 博来霉素; 残留; 含量测定

Detection of Two Antibiotic Residues in Human Erythropoietin Injection and Human Erythropoietin for Injection by UPLC - MS / MS

TANG Na, SU Chaonan, CHEN Tonghua, XIAO Yitong, WANG Changhe, XU Changgen
(Shaanxi Institute for Food and Drug Control, Xi'an, Shaanxi, China 710065)

Abstract: Objective To establish an ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) method for determining the ampicillin and bleomycin residues in Human Erythropoietin Injection and Human Erythropoietin for Injection. **Methods** The chromatographic column was the Waters Cortecs T3 column (100 mm × 2.1 mm, 2.7 μm), the mobile phase was 0.1% formic acid aqueous solution - [acetonitrile - methanol (95:5, V/V)] with gradient elution, the flow rate was 0.2 mL/min, the column temperature was 40 °C, and the injection volume was 5 μL. The electron spray ionization with positive ion mode and multiple reaction monitoring mode was adopted. **Results** The linear ranges of ampicillin and bleomycin were 19.38 - 484.5 ng/mL ($r=0.9979, n=5$) and 21.26 - 212.6 ng/mL ($r=0.9988, n=5$) respectively. The limits of detection of ampicillin and bleomycin were 0.00969, 10.63 ng/mL, respectively, and their limits of quantification were 0.0969, 21.26 ng/mL, respectively. The RSDs of precision and stability tests were lower than 4.0%. The average recovery rates of the above two antibiotics were 102.11% and 101.77%, with RSDs of 7.46% and 13.35% respectively. The matrix effects of ampicillin and bleomycin were not obvious, with 95.03% and 84.51%, respectively. No ampicillin or bleomycin was detected in 39 batches of Human Erythropoietin Injection and Human Erythropoietin for Injection from nine domestic manufacturing enterprises and one foreign manufacturing enterprise. **Conclusion** The established method is simple, sensitive and accurate, which can be used to detect ampicillin and bleomycin residues in Human Erythropoietin Injection and Human Erythropoietin for Injection.

Key words: Human Erythropoietin Injection; Human Erythropoietin for Injection; UPLC-MS/MS; ampicillin; bleomycin; residue; content determination

人促红素注射剂是由利用基因重组技术构建高效表达人促红素基因的中国仓鼠卵巢细胞,经细胞培养、分离和高度纯化后获得的人促红素制成,属治疗类生物制品,临床用于肾功能不全所致贫血、非骨髓恶性肿瘤化学药物治疗所致贫血、外科围术期红细胞动员等症^[1-4]。为防止细菌污染,生物制品在菌株构建、药物筛选及生产过程中,会添加博来霉素等抗生素^[5];在治疗类生物制品(如重组蛋白、单克隆抗体等)中常添加氨苄西林、卡那霉素等抗生素^[6]。近年

来,生物制品中的抗生素残留问题已受到广泛关注^[6-7]。国家药品监督管理局要求严格控制其生产过程中抗生素的使用^[8]。目前抗生素的检测方法主要有微生物法^[9-11]、免疫学方法^[12-13]、薄层色谱法^[14]、高效液相色谱法^[15]和液质联用法^[16-19]等。其中,液质联用法灵敏度和准确度高、分析速度快、选择性强、结果可靠,被广泛用于抗生素的残留检测分析^[20]。基于此,本研究中建立了同时测定人促红素注射剂中氨苄西林和博来霉素残留量的超高效液相色谱串联质谱

第一作者:唐娜,女,博士,副主任药师,研究方向为药物质量控制,(电子信箱)tnlb2000@126.com。

[△]通信作者:徐长根,女,硕士,主任药师,研究方向为药物质量控制,(电子信箱)45928950@qq.com。

(UPLC - MS / MS)法, 以期控制生物制品的质量提供参考。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

AB CTO - 20AC型超高效液相色谱仪、QTRAP5500型质谱仪, 购自美国AB SCIEX公司; XPE205型电子分析天平(瑞士Mettler Toledo公司, 精度为0.01 mg); Synergy UV R型超纯水机(美国Millipore公司)。

1.2 试剂

人促红素注射剂[共39批, 包括人促红素注射液28批(编号为S1 - S28)和注射用人促红素11批(编号为S29 - S39), 来自9家国内生产企业与1家国外生产企业]。氨苄西林对照品(中国食品药品检定研究院, 批号为130410 - 201908, 含量85.6%), 硫酸博来霉素对照品(美国MedChemExpress公司, 批号为145395, 含量99.6%); 甲醇、乙腈均为色谱纯, 乙酸、甲酸均为分析纯, 水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 试验条件

色谱条件: 色谱柱为Waters Cortecs T3柱(100 mm × 2.1 mm, 2.7 μm); 流动相为0.1%甲酸水溶液(A) - [乙腈 - 甲醇(95:5, V/V)](B), 梯度洗脱(0~3 min时2%B, 3.1~6 min时40%B, 6.1~8 min时90%B, 8~8.1 min时2%B, 8.1~15 min时保持2%B); 流速为0.2 mL/min; 柱温为40 °C; 进样量为5 μL; 切进质谱时间为0~7 min; 切进废液时间为7~15 min。

质谱条件: 电喷雾离子源正离子模式(ESI⁺), 多反应监测(MRM)扫描模式; 离子源喷雾电压为5 500 V, 离子源温度为550 °C, 雾化气压力为55 psi, 辅助加热器压力为55 psi, 气帘气压力为35 psi。2种待测成分部分质谱参数见表1, 对照品溶液质谱图见图1。

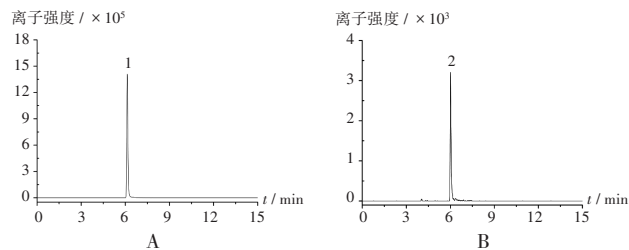
表1 部分质谱参数

Tab. 1 Partial mass spectrometry parameters

| 待测成分 | 定性离子对 m/z | 定量离子对 m/z | 去簇电压(V) | 碰撞电压(V) | 保留时间(min) |
|------|-------------|-------------|---------|---------|-----------|
| 氨苄西林 | 350/160 | 350/106 | 78 | 16/22 | 6.14 |
| 博来霉素 | 472/551.1 | 472/493.4 | 65 | 22/14.4 | 6.02 |

2.2 溶液制备

对照品溶液: 取氨苄西林对照品11.32 mg, 精密称定, 置10 mL容量瓶中, 加0.3%乙酸水溶液定容, 摇匀, 即得对照品贮备液I; 分别精密量取适量, 加0.3%乙酸水溶液制成质量浓度为20, 50, 100, 200, 500 ng/mL的系列对照品溶液I。取硫酸博来霉素对照品10.67 mg, 精密称定, 置10 mL容量瓶中, 加0.3%乙酸水溶液定容, 摇匀, 即得对照品贮备液II; 分别精密量取适量, 加0.3%乙酸水溶液制成质量浓度为20, 50, 100, 150,



1. 氨苄西林 2. 博来霉素
A. 氨苄西林对照品溶液 B. 博来霉素对照品溶液

图1 超高效液相色谱串联质谱图

1. Ampicillin 2. Bleomycin

A. Ampicillin reference solution B. Bleomycin reference solution

Fig. 1 UPLC - MS / MS chromatograms

200 ng/mL的系列对照品溶液II。

供试品溶液: 取注射用人促红素3瓶, 分别精密加入0.3%乙酸水溶液1 mL使溶解, 混匀, 即得供试品溶液I; 取人促红素注射液3瓶, 混匀, 精密量取1 mL, 即得供试品溶液II。

2.3 方法学考察

线性关系考察: 精密量取2.2项下系列对照品溶液I和II各适量, 按2.1项下试验条件进样测定, 记录峰面积。以各待测成分的质量浓度(X , ng/mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归, 得氨苄西林和博来霉素回归方程分别为 $Y_1 = 63\ 836.9X_1 + 1\ 055\ 460$ ($r = 0.997\ 9, n = 5$)和 $Y_2 = 73.928\ 64X_2 - 1\ 104.007\ 19$ ($r = 0.998\ 8, n = 5$)。结果表明, 氨苄西林和博来霉素质量浓度分别在19.38~484.5 ng/mL、21.26~212.6 ng/mL范围内与峰面积线性关系良好。

检测限和定量限考察: 精密量取2.2项下对照品贮备液I和II各适量, 逐级稀释, 按2.1项下试验条件进样测定, 记录峰面积。以信噪比(S/N)分别为3:1和10:1时待测成分质量浓度为检测限和定量限。结果氨苄西林和博来霉素的检测限分别为0.009 69 ng/mL和10.63 ng/mL, 定量限分别为0.096 9 ng/mL和21.26 ng/mL。

精密度试验: 分别精密量取2.2项下氨苄西林对照品溶液和博来霉素(质量浓度均为100 μg/mL), 按2.1项下试验条件连续进样测定6次, 记录峰面积。结果氨苄西林和博来霉素的RSD分别为0.86%和3.60% ($n = 6$), 表明仪器精密度良好。

稳定性试验: 取氨苄西林对照品、博来霉素对照品各适量, 按2.2项下方法分别制备对照品溶液, 分别于室温下放置0, 2, 4, 8, 12, 24 h时按2.1项下试验条件进样测定, 记录峰面积。结果氨苄西林和博来霉素的RSD分别为2.32%, 3.93% ($n = 6$), 表明对照品溶液室温放置24 h内基本稳定。

回收试验: 取已知含量的样品(编号S1)适量, 各9份,

表2 回收试验结果(n=9)
Tab. 2 Results of the recovery test (n=9)

| 加入量(ng) | | 测得量(ng) | | 回收率(%) | | \bar{X} (%) | | RSD(%) | |
|---------|---------|---------|---------|--------|--------|---------------|--------|--------|-------|
| A | B | A | B | A | B | A | B | A | B |
| 484.50 | 531.36 | 440.10 | 635.63 | 90.84 | 119.62 | | | | |
| 484.50 | 531.36 | 448.61 | 623.53 | 92.59 | 117.35 | | | | |
| 484.50 | 531.36 | 451.52 | 586.32 | 93.19 | 110.34 | | | | |
| 2422.48 | 796.99 | 2545.33 | 706.11 | 105.07 | 88.60 | | | | |
| 2422.48 | 796.99 | 2537.21 | 675.09 | 104.74 | 84.70 | 102.11 | 101.77 | 7.46 | 13.35 |
| 2422.48 | 796.99 | 2567.62 | 663.32 | 105.99 | 83.23 | | | | |
| 4844.96 | 1062.72 | 5290.08 | 1118.61 | 109.19 | 105.26 | | | | |
| 4844.96 | 1062.72 | 5266.10 | 1128.55 | 108.69 | 106.19 | | | | |
| 4844.96 | 1062.72 | 5265.21 | 1069.07 | 108.67 | 100.60 | | | | |

注:A为氨苄西林,B为博来霉素。

Note:A refers to ampicillin, and B refers to bleomycin.

分别精密加入2.2项下对照品贮备液I和II,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下试验条件进样测定,记录峰面积,并计算回收率。结果见表2。

基质效应考察^[21-22]:分别用空白基质溶液和0.3%乙酸水溶液,配制氨苄西林和博来霉素质量浓度均为20 ng/mL的混合对照品溶液,按2.1项下试验条件进样测定,记录峰面积,并计算其比值(基质效应)。结果2种待测成分的基质效应分别为95.03%和84.51%,均可认定为基质效应不明显。

2.4 样品测定

取39批样品,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下试验条件进样测定,记录峰面积。结果所有样品均未检出氨苄西林和博来霉素。

3 讨论

抗生素是由微生物或高等动植物产生的具有抗病原体或其他活性的一类次级代谢产物。为防止细菌污染等,生物制品在菌株构建、药物筛选及生产过程中会添加某些种类的抗生素,而在成品制成的过程中又需将其去除。因此,控制生物制品中的抗生素残留对保障消费者安全十分重要。美国药典、欧洲药典和中国药典中均对生物制品中抗生素的使用种类和阶段进行了严格限制。本研究中考虑到治疗类生物制品(如重组蛋白)中会添加氨苄西林、博来霉素等抗生素,为确保用药安全,采用UPLC-MS/MS法对人促红素注射剂中可能存在的抗生素进行检测。我国获批的人促红素注射剂共涉及11家国内生产企业,本研究中收集的样品涉及其中81.82%(9家),并纳入1家国外生产企业,结果显示,各企业对人促红素注射剂的抗生素残留控制较好。

综上所述,本研究中建立的方法操作简便,灵敏度高,准确度高,可有效控制人促红素注射剂中氨苄西林和博来霉素的残留量。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(三部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 291-293.
- [2] ABELS RI. Recombinant human erythropoietin in the treatment of the anaemia of cancer[J]. Acta Haematol, 1992, 87(Suppl 1): 4-11.
- [3] ESCHBACH JW, EGRIE JC, DOWNING MR, et al. Correction of the anemia of end-stage renal disease with recombinant human erythropoietin. Results of a combined phase I and II clinical trial[J]. N Engl J Med, 1987, 316(2): 73-78.
- [4] 李响, 陶磊, 韩春梅, 等. 重组人促红素理化对照品的质量评价[J]. 药物分析杂志, 2017, 37(6): 1117-1126.
- [5] 张致平. β -内酰胺类抗生素研究的进展[J]. 中国新药杂志, 2002, 11(1): 61-67.
- [6] 徐传学, 顾长龙, 方雅, 等. 生物制品中抗生素的使用及残留检测方法[J]. 国外医药: 抗生素分册, 2017, 38(4): 79-183.
- [7] WIDYASARI - MEHTA A, HARTUNG S, KREUZIG R. From the application of antibiotics to antibiotic residues in liquid manures and digestates: A screening study in one European center of conventional pig husbandry [J]. Journal of Environmental Management, 2016, 177: 129-137.
- [8] 国家食品药品监督管理局. 关于进一步规范生物制品质量控制要求的通告[A/OL]. (2009-04-14)[2023-07-07]. <https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/ggtg/ypggtg/ypqgtgtg/20090403112701493.html>.
- [9] 吴芹, 王玉莲, 袁宗辉. 动物源性食品中抗菌药残留的微生物学检测技术研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2017, 44(11): 3340-3350.
- [10] 王志强, 胡国媛, 李志勇, 等. 微生物抑制法快速检测动物源性食品多种抗生素残留[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(9): 1732-1734.
- [11] 邢进, 冯育芳, 岳秉飞, 等. 微生物法检测实验动物血清中的抗生素残留[J]. 中国比较医学杂志, 2013, 23(4): 57-60.
- [12] 陈霞, 杨晓霞, 骆朋辉, 等. 高灵敏度酶联免疫法快速检测动物源性产品中氯霉素残留的研究[J]. 中国畜牧兽医, 2013, 40(6): 233-236.
- [13] 张胜帮, 董士华, 刘继东, 等. 酶联免疫检测法测定水产品中残留氯霉素的研究[J]. 中国食品学报, 2006, 6(5): 133-136.
- [14] 王小莺, 杨海翠. 薄层色谱法检测饲料中的恩拉霉素[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2014(17): 208-209.
- [15] 李晓翠, 曹国颖, 刘茜, 等. 高效液相色谱法测定多粘菌素B₁在大鼠体内的浓度[J]. 中国临床药理学杂志, 2012, 28(3): 200-202.
- [16] 杜业刚, 阳洪波, 古丽君, 等. UPLC-MS/MS法同时测定动物源性食品中8种多肽类抗生素[J]. 食品工业科技, 2016, 37(8): 85-91.
- [17] 钱卓真, 罗冬莲, 罗方方, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定养殖环境沉积物中多肽类抗生素残留量[J]. 分析化学, 2016, 44(6): 870-875.
- [18] 龚兰, 梁枫婷, 温天锐, 等. 固相萃取净化/高效液相色谱-串联质谱法测定饲料中7种大环内酯类药物含量[J].