

二维液相色谱法检测注射用核糖核酸 I / II / III 中苯酚残留量

徐明明¹, 郑璐侠¹, 邵泓¹, 杨新磊², 陈钢^{1*}

(1. 上海市食品药品检验所, 上海 201203; 2. 安捷伦科(中国)有限公司, 上海 200085)

摘要 目的: 采用二维液相色谱法检测注射用核糖核酸 I / II / III 中苯酚的残留量, 并对方法进行验证。**方法:** 一维色谱采用 ACQUITY UPLC BEH200SEC (150 mm × 4.6 mm, 1.7 μm; 填料: 亚乙基桥杂化二醇包膜颗粒) 色谱柱, 流动相为 0.1 mol · L⁻¹ 磷酸二氢钠溶液 (pH 7.0), 流速 0.2 mL · min⁻¹, 检测波长 267 nm, 柱温 30 °C; 二维色谱采用 Inertsil ODS SP (4.6 mm × 250 mm, 5 μm; 填料: 高纯硅胶) 色谱柱, 以 ZORBAX SB-Aq 保护柱 (4.6 mm × 20 mm, 5 μm; 填料: 经二异丙基修饰的硅氧烷键合硅胶) 作为富集柱, 流动相为 25% 甲醇, 流速 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长 267 nm, 柱温 30 °C。检测核糖核酸 (RNA) 样品分别为来自健康猪肝脏的核糖核酸 I, 来源于牛胰脏的核糖核酸 II, 以及来源于猪脾脏的核糖核酸 III。**结果:** 苯酚质量浓度在 0.246 6~2.219 4 μg · mL⁻¹ 范围内与峰面积呈良好线性 ($r=0.999\ 7$), 回收率在 99.7%~100.3%; 企业 A 的注射用核糖核酸 I 和企业 D 的注射用核糖核酸 III 样品中均未检出苯酚, 企业 B 的注射用核糖核酸 I 样品中苯酚残留量为 0.002%, 企业 C 的注射用核糖核酸 II 样品中苯酚残留量为 0.008%。**结论:** 本实验建立的二维液相色谱方法能用于注射用核糖核酸 I / II / III 中苯酚残留量的检测。

关键词: 猪肝脏核糖核酸 I; 牛胰脏核糖核酸 II; 猪脾脏核糖核酸 III; 苯酚残留检测; 二维液相色谱

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793 (2017) 03-0502-06

doi: 10.16155/j.0254-1793.2017.03.19

Determination of residual phenol content in ribonucleic acid I / II / III for injection by two-dimensional liquid chromatography

XU Ming-ming¹, ZHENG Lu-xia¹, SHAO Hong¹, YANG Xin-lei², CHEN Gang^{1*}

(1. Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203, China;

2. Agilent Scientific China Company, Shanghai 200085, China)

Abstract Objective: To determine the residual phenol content in ribonucleic acid I / II / III for injection by two-dimensional liquid chromatography, and to validate the method. **Methods:** In the first dimensional chromatography, an ACQUITY UPLC BEH200 SEC (150 mm × 4.6 mm, 1.7 μm; column packing: ethylene bridged hybrid diol coated particles) column was used as stationary phase and 0.1 mol · L⁻¹ sodium dihydrogen phosphate (pH 7.0) as the mobile phase; the flow rate was 0.2 mL · min⁻¹; the column temperature was maintained at 30 °C with an ultraviolet detection of 267 nm for analysis. The target peak from the first dimensional LC was trapped in ZORBAX SB-Aq column (4.6 mm × 20 mm, 5 μm; column packing: silicone bonded silica gel modified by diisopropyl) and

* 通信作者 Tel: (021) 50798175; E-mail: chengang@smda.gov.cn

第一作者 Tel: (021) 38839900-26103; E-mail: xmm514@126.com

then was separated from pump of the second dimensional chromatography. An Inertsil ODS SP column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm; column packing: high purity silica gel) was used in the second dimensional chromatography, with 25% methanol as the mobile phase, the flow rate was 1.0 mL · min⁻¹, the column temperature was maintained at 30 °C with an ultraviolet detection of 267 nm for analysis. Ribonucleic acid I from pig liver, ribonucleic acid II from bovine pancreas and ribonucleic acid III from porcine pancreas were detected. **Results:** The calibration curve of phenol was linear in the concentration range of 0.246 6–2.219 4 μg · mL⁻¹ ($r=0.999\ 7$). The recoveries were 99.7%–100.3%. The phenol was not detectable in ribonucleic acid I for injection produced by enterprise A and ribonucleic acid III for injection produced by enterprise D. The phenol in ribonucleic acid I for injection produced by enterprise B is 0.002%, and the phenol in ribonucleic acid II for injection produced by enterprise C is 0.008%. **Conclusion:** The established two-dimensional liquid chromatographic method can be used for the determination of residual phenol content in ribonucleic acid I / II / III for injection.

Keywords: ribonucleic acid I for injection from pig liver; ribonucleic acid II for injection from bovine pancreas; ribonucleic acid III for injection from porcine pancreas; detection of phenol residues; two-dimensional liquid chromatography

核糖核酸 I / II / III 是分别从健康猪肝脏、牛胰脏以及猪脾脏中提取分离的核糖核酸 (RNA), 它的基本单位是核苷酸, 是由几十个至几千个核苷酸聚合而成的长链, 每一种 RNA 都有一定的核苷酸排列顺序和二、三级结构。生产企业均在核糖核酸生产工艺中使用了苯酚进行提取纯化^[1], 后续工艺如果没有有效地去除环节, 可能带来安全隐患。因此注射用核糖核酸 I / II / III 中苯酚残留量是需要检测并严格控制的指标, 而目前注射用核糖核酸 I / II / III 的国家标准^[2-4]中均未对苯酚进行控制。苯酚的限度参照中国药典 2015 年版^[5]下, 按 ICH 第 2 类溶剂最严限度要求定为 0.006%。

核糖核酸 I / II / III 是从动物脏器中提取的多组分生化药, 成分复杂, 包含有小分子核苷、核苷酸以及大分子核糖核酸片段 (几个至几百个核苷酸), 分子量范围跨度从几百到几万。而苯酚与核苷、核苷酸、小分子核糖核酸短片段性质相似, 分子量相差小, 因此采用高效液相色谱法^[6-7]和气相色谱法^[8-9]测定注射用核糖核酸 I / II / III 中的苯酚残留量时, 核苷、核苷酸、核糖核酸短片段对苯酚产生干扰, 相互之间不能有效分离。本文采用二维液相色谱方法, 通过一维凝胶色谱柱将苯酚与核糖核酸主成分按照分子量大小进行初步分离, 并确定苯酚的出峰位置, 然后通过中心切割方法将苯酚及其共流出的干扰物质切换到富集柱上进行捕集, 再通过阀切换将捕集到的苯酚及共流出物从富集柱上洗脱至第二维反相色谱柱上进行分离, 从而准确测定注射用核糖核酸 I / II / III 中

苯酚的残留量。

1 仪器与试剂

Agilent 公司二维液相色谱系统: 第一维由 Agilent 1100 二元泵, 自动进样器, 柱温箱和二极管阵列检测器组成, 第二维由 Agilent 1260 四元泵、柱温箱 (内置 2 位 - 六通阀) 和紫外检测器组成。Waters 公司 ACQUITY UPLC BEH 200 SEC (150 mm × 4.6 mm, 1.7 μm; 填料: 亚乙基桥杂化二醇包膜颗粒) 色谱柱, Agilent 公司 ZORBAX SB-Aq 保护柱 (4.6 mm × 20 mm, 5 μm; 填料: 经二异丙基修饰的硅氧烷键合硅胶), 岛津公司 Inertsil ODS SP (4.6 mm × 250 mm, 5 μm; 填料: 高纯硅胶) 色谱柱。色谱数据软件为 OpenLabChemstation C0105。流路图如图 1 所示。

苯酚对照品 (批号 100509-201203, 含量 100.0%, 中国食品药品检定研究院); 注射用核糖核酸 I 2 批 (企业 A: 批号 150401; 企业 B: 批号 1505011), 注射用核糖核酸 II 1 批 (企业 C: 批号 B140119), 注射用核糖核酸 III 1 批 (企业 D: 批号 15042225); 甲醇为色谱纯, 磷酸二氢钠、氢氧化钠、磷酸等均为分析纯, 水为去离子水。

2 方法与结果

2.1 溶液配制

2.1.1 对照品溶液 取苯酚对照品适量, 加水制成每 1 mL 中约含 2.4 μg 的溶液, 作为对照品储备溶液; 精密量取对照品储备溶液 5 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加水稀释至刻度, 即得对照品溶液。

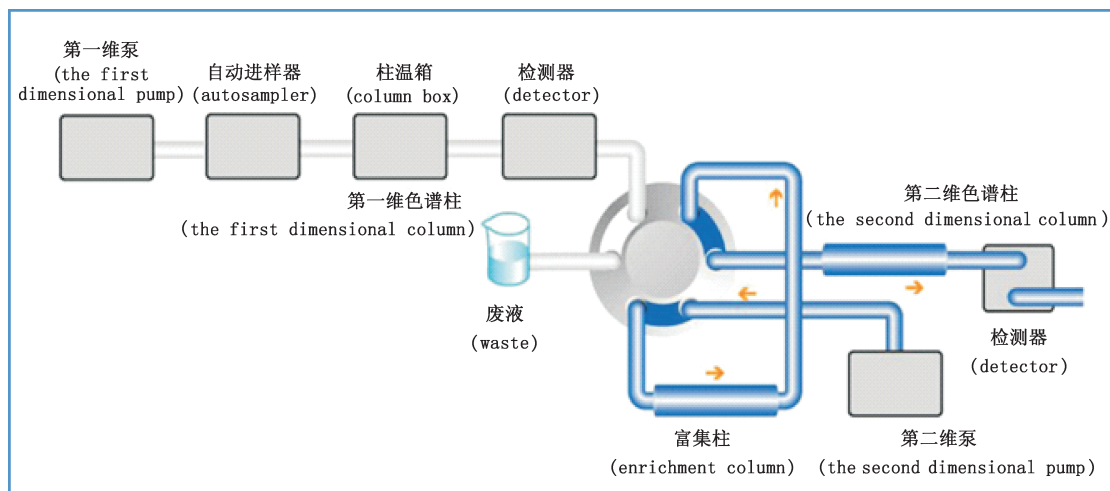


图1 二维色谱流路连接图

Fig. 1 Flow diagram of two-dimensional liquid chromatography

2.1.2 供试品溶液 分别取注射用核糖核酸Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ样品适量,加水溶解并稀释制成每1 mL中含20 mg的溶液,作为供试品溶液。

2.2 色谱条件

一维色谱条件:采用 ACQUITY UPLC BEH200 SEC (150 mm×4.6 mm, 1.7 μm) 色谱柱,以 0.1 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钠溶液 (pH 7.0) 为流动相,流速 0.2 mL·min⁻¹,检测器为 DAD,检测波长为 267 nm,柱温 30℃,进样量 100 μL。二维色谱条件:采用 Inertsil ODS SP (4.6 mm×250 mm, 5 μm) 色谱柱,以 Agilent ZORBAX SB-Aq 保护柱 (4.6 mm×20 mm, 5 μm) 作为富集柱,以 25% 甲醇为流动相,流速 1.0 mL·min⁻¹,检测器为 VWD,检测波长为 267 nm,柱温 30℃。阀切换时间为 18~20.5 min。

按上述色谱条件测定,对照品溶液和供试品溶液的一维色谱图和二维色谱图见图 2。

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系考察与检测限测定 精密量取对照品储备溶液 1、3、5、7 和 9 mL,分别置 10 mL 量瓶中,加水稀释至刻度,即得线性溶液 L1~L5,照“2.2”项下色谱条件,分别注入液相色谱仪,记录色谱图,以苯酚的峰面积 *A* 为纵坐标,相应质量浓度 *C* 为横坐标,进行线性回归,得标准曲线方程:

$$A=137.046C-7.220 \quad r=0.9997$$

结果表明,苯酚质量浓度在 0.246 6~2.219 4 μg·mL⁻¹ 范围内与峰面积呈良好线性。取线性溶液 L1 逐级稀释,进样测定,检测限 (*S/N*=3.1) 为 12 ng·mL⁻¹。

2.3.2 精密度、重复性试验 取“2.1.1”项下对照品

溶液,按上述色谱条件连续进样 6 次,结果苯酚峰面积的 RSD 为 0.4%,表明仪器精密性良好;取注射用核糖核酸Ⅱ (批号 B140119) 6 份,分别按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,进样测定,结果苯酚平均含量 (*n*=6) 为 0.008%,RSD 为 0.8%。

2.3.3 回收率试验 精密量取线性溶液 L3、L4 和 L5 各 5 mL,分别置 10 mL 量瓶中,精密加入供试品溶液 (样品批号 1505011) 5 mL,摇匀,制成低、中、高 3 个浓度的溶液,每个水平各 3 份,分别进样测定,回收率结果见表 1。

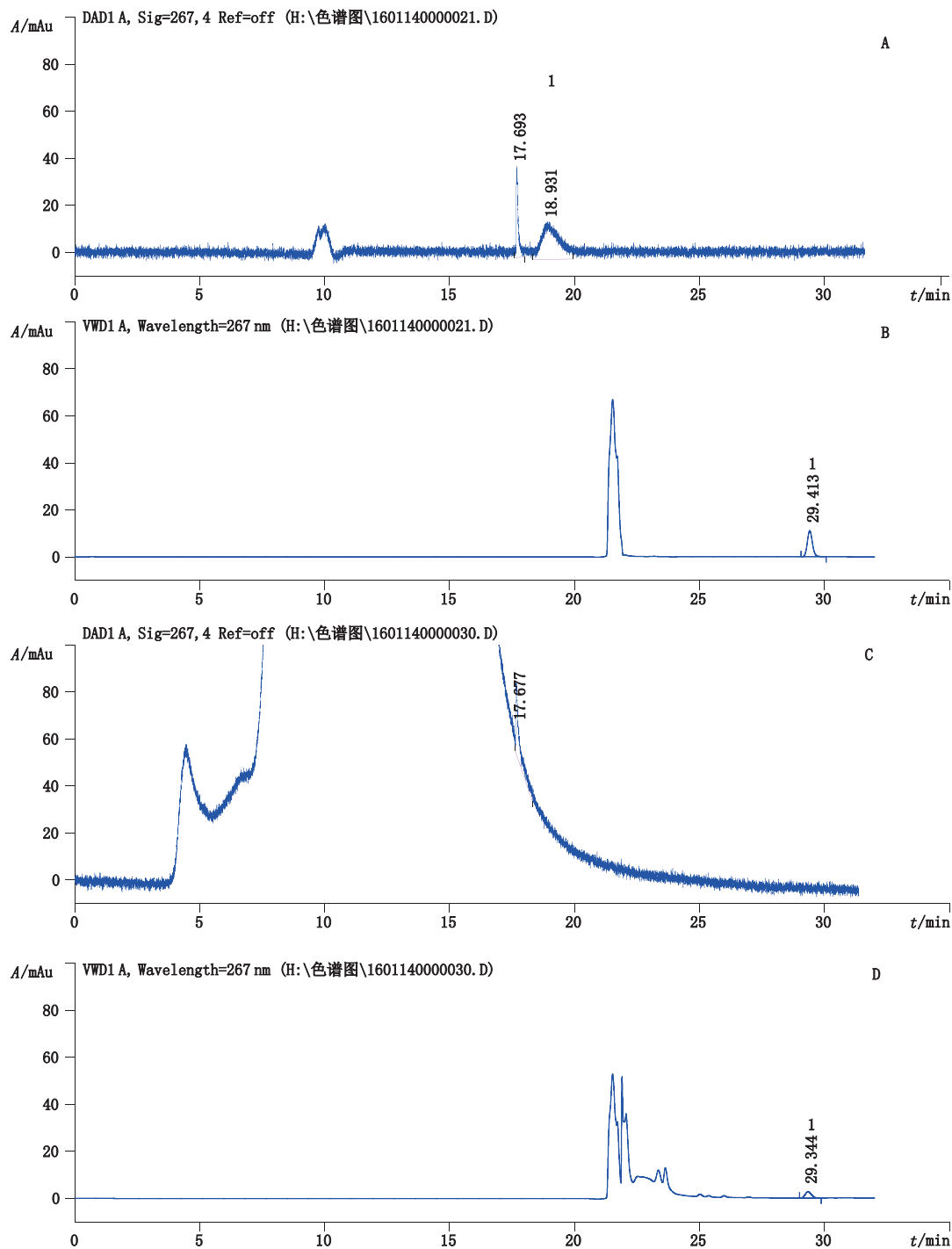
2.4 样品测定

取供试品溶液按“2.2”项下色谱条件进样测定,以外标法计算苯酚含量,结果见表 2。

3 讨论

3.1 二维液相色谱的选择

采用反相高效液相色谱法^[6-7]直接测定注射用核糖核酸Ⅰ/Ⅱ/Ⅲ中苯酚残留量的色谱图见图 3。一方面苯酚与核苷、核苷酸、小分子核糖核酸短片段性质相似,苯酚与周围干扰峰不能达到基线分离甚至其他峰在同一保留时间也有出峰,导致方法测定结果不准确,另一方面苯酚在核糖核酸主成分峰的拖尾处出峰,基线的影响导致苯酚的检测灵敏度低,方法的准确性差,测定其回收率低于 80%,因此不能准确测定注射用核糖核酸Ⅰ/Ⅱ/Ⅲ中苯酚残留量。而气相色谱法^[8-9]测定苯酚的检测限相对于液相色谱法要高几倍,不适于苯酚残留量的检测,且核苷、核苷酸、小分子核糖核酸短片段对苯酚测定也存在干扰。



1. 苯酚 (phenol)

A. 对照品溶液一维色谱图 (the first dimensional chromatogram of reference solution) B. 对照品溶液二维色谱图 (the second dimensional chromatogram of reference solution) C. 注射用核糖核酸 I (批号 1505011) 供试品溶液一维色谱图 [the first dimensional chromatogram of test solution of ribonucleic acid I for injection (lot No. 1505011)] D. 注射用核糖核酸 I (批号 1505011) 供试品溶液二维色谱图 [the second dimensional chromatogram of test solution of ribonucleic acid I for injection (lot No. 1505011)]

图 2 液相色谱图

Fig. 2 Liquid chromatograms

表 1 加样回收率试验结果

Tab. 1 The results of recovery test

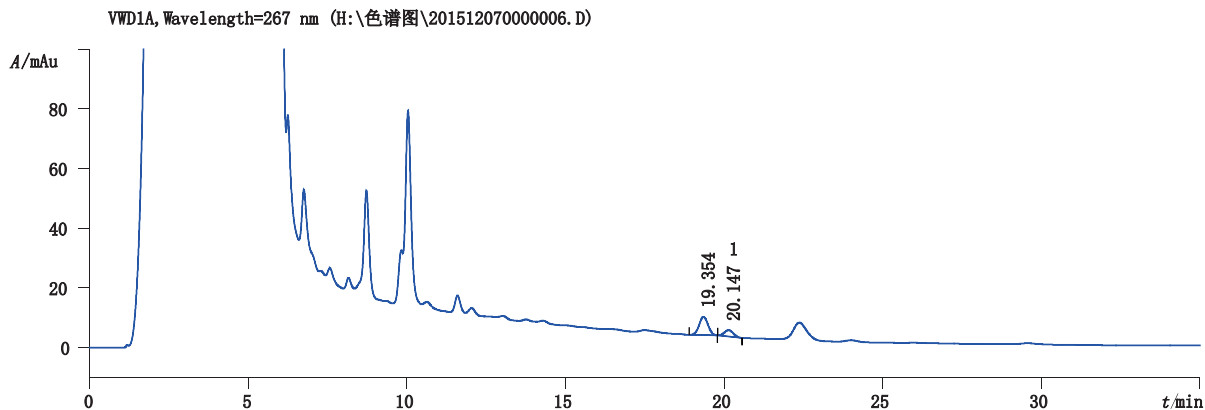
加入量 (added) /μg	原有量 (original) /μg	测得值 (measured) /μg	回收率 (recovery) /%	平均回收率 (mean recovery) /% (n=3)	RSD/%
6.165	2.000	8.186	100.3	99.7	0.7
	2.000	8.101	99.0		
	2.000	8.149	99.7		
8.631	2.000	10.576	99.4	100.3	1.0
	2.000	10.751	101.4		
	2.000	10.654	100.3		
11.097	2.000	13.076	99.8	100.2	0.4
	2.000	13.161	100.6		
	2.000	13.120	100.2		

表 2 苯酚残留量测定结果

Tab. 2 The results of residual phenol contents

样品 (sample)	批号 (lot No.)	苯酚含量 (phenol content) /%
注射用核糖核酸 I (ribonucleic acid I for injection)	150401	0
	1505011	0.002
注射用核糖核酸 II (ribonucleic acid II for injection)	B140119	0.008
注射用核糖核酸 III (ribonucleic acid III for injection)	15042225	0

而二维液相色谱法的应用之一就是可以解决此类问题,在一维色谱中未分离的组分可由接口转移到第二维色谱中继续进行分离,以达到完全分离准确测定的效果。因此本文探索了二维液相色谱法检测注射用核糖核酸 I / II / III 中苯酚残留量,本法检测灵敏度高,可将苯酚从复杂组分中分离从而准确测定其残留。



1. 苯酚 (phenol)

图 3 注射用核糖核酸 I (批号 1505011) 供试品溶液色谱图

Fig. 3 HPLC chromatogram for the test solution of ribonucleic acid I for injection (lot No. 1505011)

3.2 二维液相色谱的构建^[10-15]

本文在原有液相色谱仪的基础上增加了另 1 个四元泵、1 个检测器和 1 个内置了 2 位 - 六通阀的柱温箱,实现了在线二维液相色谱。而二维液相色谱方法的实现关键则在于找到适合样品分析的两维色谱柱,以及实现分子排阻色谱 (SEC) 和反相液相色谱 (RPLC) 这 2 种分离模式之间的转换。SEC 和 RPLC 具有不同的分离能力,选择性差异大并且 SEC 与 RPLC 采用相互兼容的流动相,比较容易形成有效的二维分析方法。本文方法苯酚经第一维

的 SEC 色谱柱分离后峰宽近 2 min,洗脱体积近 400 μL,如果使用样品环进行收集,会增加系统死体积同时容易造成第二维色谱柱过载,因此本文采用富集柱代替样品环对苯酚进行捕集,具体连接方式见图 1。第一维选择 SEC 柱将苯酚与核糖核酸主成分按照分子量大小进行初步分离,并确定苯酚的出峰位置的起始点和终止点,然后对苯酚和共流出的干扰物质进行中心切割,捕集完成后再通过阀切换将苯酚及共流出干扰物质冲洗至第二维反相柱进行分离检测。

3.3 富集柱的选择及阀切换时间

采用富集柱方式的中心切割二维液相色谱方法,富集柱的选择至关重要,将直接影响到待测物的回收率以及分离效率。苯酚在富集柱上的保留不能太弱,否则在中心切割过程中苯酚直接被洗脱出去,造成回收率降低,必须保证苯酚在捕集柱上的保留时间大于苯酚在一维色谱上的峰宽。另一方面,苯酚在富集柱上的保留也不能太强,否则捕集后不易洗脱,峰形太宽。通过尝试多根色谱短柱后,最终选择了2 mm的ZORBAX SB-Aq保护柱。对于苯酚的保留大于3 min,阀切换时间为18~20.5 min,共2.5 min。从第一维液相切换到第二维液相的时候,由于两者的流动相不同等因素,会导致在阀切换刚开始的一段时间流出第一维流动相的色谱峰,例如图2-B。而在图2-D中除了上游溶剂峰,还会存在所切片段中其他组分的色谱峰。

4 结论

本文建立的二维液相色谱方法能用于注射用核糖核酸I/II/III中苯酚残留量的检测,解决了共流出物和核糖核酸主成分峰拖尾对苯酚测定的干扰,提高了检测灵敏度,为复杂组分中检测低残留量的化学物质提供了一个新思路。

参考文献

- [1] 杨琳,闫素志,张金岩,等.注射用核糖核酸制备工艺的改进[J].中国生物制品学杂志,2006,19(4):418
YANG L, YAN SZ, ZHANG JY, *et al.* Improvement of preparation technology of ribonucleic acid[J]. Chin J Biol, 2006, 19(4): 418
- [2] 国家药品标准.第十六册[S].2000:97
The National Drug Standard. Vol 16[S]. 2000: 97
- [3] 国家药品标准.第十六册[S].2002:330
The National Drug Standard. Vol 16[S]. 2002: 330
- [4] 国家药品标准·第九册[S].2002:126
The National Drug Standard. Vol 9[S]. 2002: 126
- [5] 中国药典2015年版.四部[S].2015:通则0861
ChP 2015. Vol IV[S]. 2015: General Chapter 0861
- [6] 邱野,李帅,李婷婷,等.高效液相色谱法检测破伤风抗毒素注射液中苯酚残留量[J].中国生物制品学杂志,2015,28(11):1198
QIU Y, LI S, LI TT, *et al.* Determination of residual phenol content in tetanus antitoxin injection by high performance liquid chromatography[J]. Chin J Biol, 2015, 28(11): 1198
- [7] 廖海明,吕海鸿,徐康森.骨肽注射液中苯酚含量的RP-HPLC法测定[J].药物分析杂志,2005,25(4):397
LIAO HM, LÜ HH, XU KS. RP-HPLC determination of phenol in ossotide injection[J]. Chin J Pharm Anal, 2005, 25(4): 397
- [8] 徐道华,张红伟.气相色谱法测定复方薄荷脑苯酚酊中薄荷脑和苯酚的含量[J].西北药学杂志,2011,26(6):427
XU DH, ZHANG HW. Determination of the content of menthol and phenol in menthol phenol tincture by GC[J]. Northwest Pharm J, 2011, 26(6): 427
- [9] 李英,吴景武,刘丽,等.顶空固相微萃取-气相色谱质谱法测定蜂蜜中的苯酚残留量[J].分析试验室,2008,27(2):103
LI Y, WU JW, LIU L, *et al.* Determination of phenol residues in honey by headspace solid phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry[J]. Chin J Anal Lab, 2008, 27(2): 103
- [10] 裴亚,秦峰,闻宏亮,等.在线二维液相色谱-四极杆飞行时间质谱法检测头孢噻吩钠的杂质谱[J].色谱,2015,33(12):1314
QIU Y, QIN F, WEN HL, *et al.* Impurity profile study of cefalotin sodium by two-dimensional liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry[J]. Chin J Chromatogr, 2015, 33(12): 1314
- [11] 高辉,温学森,马小军,等.二维液相色谱技术在药物分析中的应用[J].药物分析杂志,2007,27(4):616
GAO H, WEN XS, MA XJ, *et al.* The technique of two-dimensional liquid chromatography (2D-LC) and its applications in drug analysis[J]. Chin J Pharm Anal, 2007, 27(4): 616
- [12] 戚绿叶,颜琳琦,张丽媛,等.二维液相色谱法测定保健食品中 V_A 、 V_{D3} 、 V_E 的含量[J].中国卫生检验杂志,2015,25(3):340
QI LY, YAN LQ, ZHANG LY, *et al.* Two-dimensional liquid chromatography method for the content determination of V_A , V_{D3} , V_E in functional food[J]. Chin J Health Lab Technol, 2015, 25(3): 340
- [13] 张智聪,张庆合,赵中一,等.二维液相色谱切换技术及其应用[J].分析化学,2005,33(5):722
ZHANG ZC, ZHANG QH, ZHAO ZY, *et al.* The switching technique of two-dimensional liquid chromatography and its applications[J]. Chin J Anal Chem, 2005, 33(5): 722
- [14] 王炼,杨碧霞,张新申,等.亲水交互作用-反相二维液相色谱-串联质谱同时测定乳制品中20中抗生素残留[J].分析化学,2015,43(5):714
WANG L, YANG BX, ZHANG XS, *et al.* Simultaneous determination of twenty antibiotics residues in dairy using hydrophilic interaction chromatography-reversed phase two dimensional liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Chin J Anal Chem, 2015, 43(5): 714
- [15] 萧伟斌,蹇阳,李桦.二维液相色谱在药物和毒物分析中的应用进展[J].分析化学,2014,42(12):1851
XIAO WB, JIAN Y, LI H. Application of two-dimensional liquid chromatography analysis of drugs and toxicants[J]. Chin J Anal Chem, 2014, 42(12): 1851

(本文于2016年3月22日收到)