

液相色谱法检测疫苗中四种常见防腐剂残留

LC-271

摘要：本文建立了一种使用液相色谱仪检测疫苗中苯酚、间甲酚、2-苯氧乙醇、羟苯甲酯防腐剂残留的方法。样品经乙腈沉淀蛋白，离心滤过后上机分析。实验结果显示：空白溶液不干扰含量测定，方法专属性较好；对照品溶液重复进样6次，四种防腐剂色谱峰保留时间和峰面积的RSD%在0.07%-0.12%和0.05%-0.35%之间，仪器精密度良好；以外标法定量，在0.5-50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内，线性相关系数均 >0.9999 ，准确度在98.3-107.7%之间；加标回收和精密度实验测试表明，方法准确度高，重复性好，可为疫苗及生物制品中四种防腐剂残留测定提供参考。

关键词：防腐剂残留 疫苗 液相色谱仪

防腐剂在疫苗生产过程中主要用于抑制微生物生长的一类重要物质。目前除了硫柳汞外，在生物制品及医药防腐剂中还常见如苯酚、间甲酚、2-苯氧乙醇、羟苯甲酯。在《中国药典》三部（2020版）关于苯酚按照通则3113进行检测，使用滴定显色法进行测定，含量应不高于3.0 g/L；间甲酚按照通则3114使用比色法进行测定，含量不高于2.5 g/L；2-苯氧乙醇按照附录2液相色谱法进行检测，应为4.0-6.0 mg/mL。

目前不同防腐剂使用不同的检测方法，对于检测机构方法种类多且工作量大，而滴定法灵敏度及误差

较大，需要工作人员有一定的视觉灵敏度和长期操作经验。目前亟需开发能同时快速用于生物制品中多种防腐剂的快速检测方法。

液相色谱仪作为一种常见便捷的色谱分析系统，在含量分析监测中广泛使用，本文建立了一种采用液相色谱仪对生物制品中苯酚、间甲酚、2-苯氧乙醇、羟苯甲酯残留量同时检测的分析方法。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-40，具体配置为：

系统控制器：CBM-40lite

脱气机：DGU-20A₅

输液泵：LC-40B XR \times 2

自动进样器：SIL-40C XR

柱温箱：CTO-40C

检测器：SPD-40V

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 GIST 100 mm \times 2.1 mm I.D., 2.0 μm ；P/N: 227-30001-04；岛津（上海）

实验器材有限公司

流动相：A-水；B-乙腈

流速：0.4 mL/min

柱温：40 $^{\circ}\text{C}$

进样体积：5 μL

检测波长：220 nm、270 nm

洗脱方式：梯度洗脱，B相初始浓度为10%，时间程序见表1。

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
7.00	Pumps	Pump B Conc.	40
7.50	Pumps	Pump B Conc.	95
9.00	Pumps	Pump B Conc.	95
9.20	Pumps	Pump B Conc.	10
13.00	Controller	Stop	

1.3 标准溶液制备

以 75% 乙腈水溶液配制苯酚、间甲酚、2- 苯氧乙醇、羟苯甲酯混合标准贮备液（1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ），同时逐级稀释为 0.5、1、2、5、10、20、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 共 6 个标准系列工作溶液，待测。

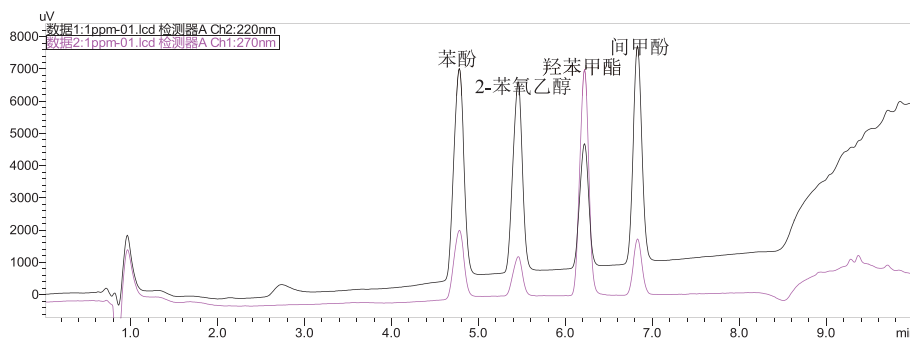
1.4 样品前处理

准确取 100 μL 样品溶液，加入 300 μL 乙腈，涡旋混匀，14000 rpm 离心 5 min，上机分析。

■ 结果与讨论

2.1 系统适应性和分离度

按照 1.2 中分析条件测试对照品溶液，色谱图如图 1 所示。通过梯度洗脱方式，四种化合物分离度良好，且分离度均大于 3（详见图 2），满足液相色谱中关于定量色谱分离度要求。


 图 1 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 四种化合物对照品溶液色谱图

ID#	化合物名	保留时间	面积	分离度(USP)
1	苯酚	4.783	52468	—
2	2-苯氧乙醇	5.460	44642	3.072
3	羟苯甲酯	6.223	27520	3.651
4	间甲酚	6.833	46521	3.070

图 2 四种化合物分离度表（220 nm 计算）

2.2 专属性

取空白溶剂进行测定，色谱图如下图 3 所示。在 270 nm（羟苯甲酯定量通道）和 220 nm（苯酚、2 苯氧乙醇、间甲酚定量通道）波长下，对照品（0.5 ppm）中四种物质出峰位置处同空白溶剂色谱图相比均无干扰，专属性良好。

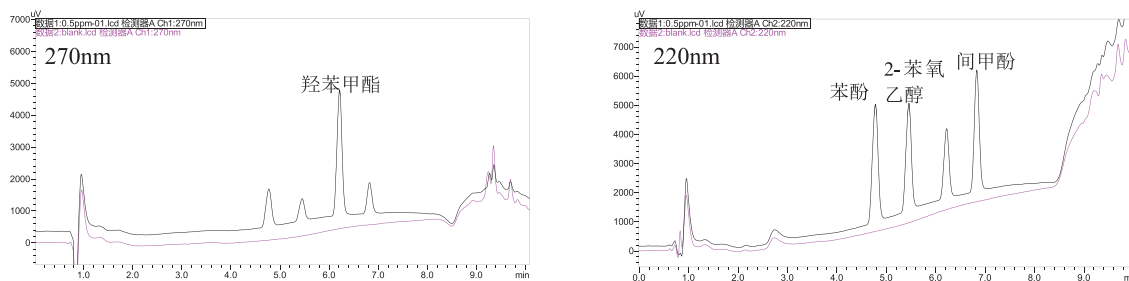


图3 对照品 (0.5 ppm) 和空白溶剂 270 nm 和 220 nm 色谱图

2.3 线性关系

按照 1.3 配制 6 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。羟苯甲酯以 270 nm 作为定量通道，苯酚、间甲酚、2- 苯氧乙醇以 220 nm 作为定量通道，以峰面积为纵坐标，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 4，线性方程、相关系数和定量限见表 2。

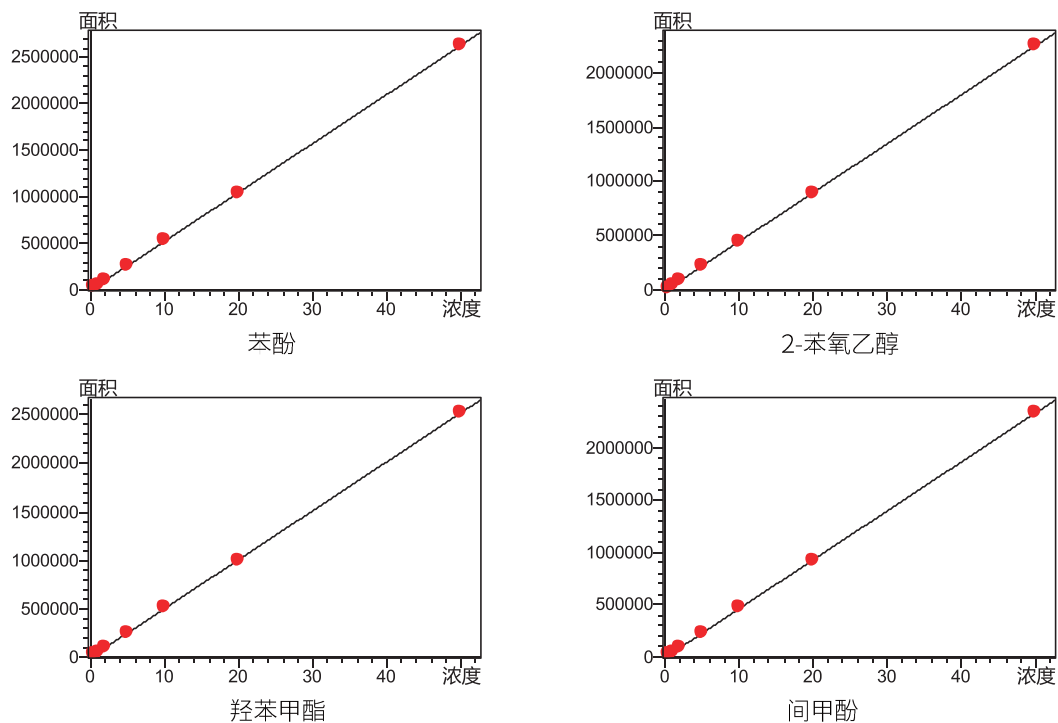


图4 标准曲线

表2 线性关系和定量限

#	名称	校准曲线	线性范围 ($\mu\text{g/mL}$)	准确度 (%)	相关系数 r	定量限 ($\mu\text{g/mL}$)	定量限 S/N
1	苯酚	$Y=52,502.2X-738.156$	0.5-50	98.4-101.8	0.9999	0.5	29.87
2	2- 苯氧乙醇	$Y=44,973.2X-2,014.03$	0.5~50	98.8~107.7	0.9999	0.5	27.03
3	羟苯甲酯	$Y=50,387.7X-137.568$	0.5-50	98.3-105.0	0.9999	0.5	23.84
4	间甲酚	$Y=46,596.7X-1,138.14$	0.5-50	98.5-103.9	0.9999	0.5	30.78

2.4 精密度实验

按照 1.2 分析条件，分别取 0.5 µg/mL、20 µg/mL 对照品溶液上机测试，并计算各化合物保留时间和峰面积的相对标准偏差（RSD），以评价系统的检测结果的重复性。表 3 结果显示，目标物保留时间和峰面积的 RSD 分别在 0.07%-0.12% 和 0.05%-0.35% 之间。精密度实验结果表明，仪器精密度良好。

表 3 精密度结果 (n=6)

名称	RSD% (0.5 µg/mL)		RSD% (20 µg/mL)	
	R.T.	Area	R.T.	Area
苯酚	0.11	0.19	0.12	0.09
2- 苯氧乙醇	0.11	0.12	0.12	0.07
羟苯甲酯	0.07	0.35	0.10	0.05
间甲酚	0.08	0.15	0.10	0.05

2.5 样品检测和加标回收实验

使用本方法检测了 A 群 C 群脑膜炎球菌多糖结合物原液样品，在阴性样品中添加标准溶液，配制为两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，样品检测结果和加标回收结果见表 4。加标回收率在 96.80~101.30% 之间，测试结果的 RSD 在 0.05~0.28% 之间，方法可靠。

表 4 样品加标回收率 (n=3)

化合物名称	样品含量 ng/mL	2 µg/mL		20 µg/mL	
		回收率 / %	RSD / %	回收率 / %	RSD / %
苯酚	N.D.	96.80	0.21	100.60	0.05
2- 苯氧乙醇 *	N.D.	99.20	0.09	101.00	0.07
羟苯甲酯	N.D.	98.00	0.28	101.10	0.19
间甲酚	N.D.	98.10	0.17	101.30	0.10

注：N.D. 表示未检出。

■ 结论

本文建立了一种使用岛津 LC-40 液相色谱测定疫苗中苯酚、间甲酚、2- 苯氧乙醇、羟苯甲酯防腐剂残留的方法。实验结果表明系统适用性试验、专属性、线性、精密度及回收率试验结果均满足检测要求，并使用该方法对 A 群 C 群脑膜炎球菌多糖结合物原液样品进行检测。本方法快速、灵敏、准确，适用于疫苗及生物制品中四种常见的苯酚、间甲酚、2- 苯氧乙醇、羟苯甲酯防腐剂的检测和监控。

岛津应用云

