

# 气相色谱法检测灭活狂犬病毒浓缩液中残留的 $\beta$ -丙内酯

山广志<sup>1,2\*</sup>, 马迅<sup>2,3</sup>, 纪宏<sup>2</sup>, 余立<sup>2#</sup> (1.中国医学科学院医药生物技术研究所, 北京 100050; 2.北京市药品检验所, 北京 100035; 3.中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)25-2357-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.25.19

**摘要** 目的: 建立检测灭活狂犬病毒浓缩液中残留的 $\beta$ -丙内酯的方法。方法: 采用直接进样的气相色谱法。色谱柱为HP-DB624毛细管柱, 程序升温; 采用氢火焰离子化检测器(FID), 载气为氮气, 流速为1.0 ml/min; 氢火焰离子化检测器温度为250 °C, 进样口温度为150 °C。以乙腈为对照品稀释溶剂, 样品溶液经离心后直接进样。结果: 乙腈和样品中其他成分对 $\beta$ -丙内酯的测定无干扰。 $\beta$ -丙内酯的检测质量浓度线性范围为1.082~1 082.0  $\mu\text{g/ml}$  ( $r=0.999 4$ ); 检测限和定量限分别为0.2、1.0 ng; 方法精密度和耐用性良好。在4批样品中未检出残留的 $\beta$ -丙内酯。结论: 建立的方法操作简便、通用性强, 可满足灭活狂犬病毒浓缩液中残留的 $\beta$ -丙内酯监控的需要。

**关键词**  $\beta$ -丙内酯; 灭活狂犬病毒浓缩液; 气相色谱法

**Determination of Residual  $\beta$ -propiolactone in Inactivated Rabies Virus Concentrate by Gas Chromatography**  
SHAN Guang-zhi<sup>1,2</sup>, MA Xun<sup>2,3</sup>, JI Hong<sup>2</sup>, YU Li<sup>2</sup> (1.Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Science, Beijing 100050, China; 2.Beijing Institute of Drug Control, Beijing 100035, China; 3.National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To develop a method for the determination of residual  $\beta$ -propiolactone in inactivated rabies virus concentrate. METHODS: Gas chromatography with direct injection was adopted. HP-DB624 capillary column was used with nitrogen as carrier gas at flow rate of 1.0 ml/min; column temperature was programmed temperature, and FID was used as detector. The detector temperature was 250 °C, and the injector temperature was 150 °C.  $\beta$ -propiolactone was dissolved in acetonitrile as reference solution, and inactivated rabies virus concentrate was direct injected for determination after centrifugation. RESULTS: There was no interference from acetonitrile and inactivated rabies virus concentrate. The linear range of  $\beta$ -propiolactone were 1.082-1 082.0  $\mu\text{g/ml}$  ( $r=0.999 4$ ). The limits of detection and quantification were 0.2 and 1.0 ng. The established method was accurate and durable.  $\beta$ -propiolactone was not found in 4 batches of inactivated rabies virus concentrate. CONCLUSIONS: The method is simple and universal, and can be used for the determination of residual  $\beta$ -propiolactone in inactivated rabies virus concentrate.

**KEYWORDS**  $\beta$ -propiolactone; Inactivated rabies virus concentrate; Gas chromatography

$\beta$ -丙内酯( $\beta$ -propiolactone)是一种优良的病毒灭活试剂, 能够直接作用于病毒核酸, 引起基因突变, 阻断病毒复制, 对病毒具有很强的灭活作用。 $\beta$ -丙内酯虽能破坏病毒核酸结构但不影响病毒壳蛋白, 因而不会破坏灭活病毒的免疫原性, 同时 $\beta$ -丙内酯极易水解成对人体无毒性的3-羟基丙酸(见图1), 故被广泛用于各种疫苗的灭活<sup>[1-2]</sup>。

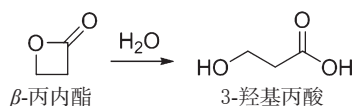


图1  $\beta$ -丙内酯水解图

Fig 1 Hydrolysis of  $\beta$ -propiolactone

$\beta$ -丙内酯极易水解, 在37 °C水浴条件下2 h即水解80%以上<sup>[3]</sup>, 在高温、加热或有离子存在时易发生聚合。 $\beta$ -丙内酯是潜在的致癌物<sup>[4]</sup>, 尽管理论上采用37 °C孵育破坏等灭活工艺能够水解灭活病毒后剩余的 $\beta$ -丙内酯, 但在具体的生产工艺研究

\* 助理研究员, 博士。研究方向: 药物质量分析。电话: 010-63021345。E-mail: IMBSGZ@gmail.com

# 通信作者: 主任药师。研究方向: 药物分析。电话: 010-83226198。E-mail: yuliy8716@vip.sina.com

以及产品质量控制过程中还是应该对 $\beta$ -丙内酯的残留情况进行监控。

有关生物制品中残留 $\beta$ -丙内酯的检测方法文献报道有液相色谱法<sup>[5-6]</sup>和气相色谱法<sup>[3, 7-9]</sup>。已有文献均采用水溶液制备 $\beta$ -丙内酯对照品溶液, 但是 $\beta$ -丙内酯在水溶液中不稳定, 降解迅速, 因此导致试验结果线性较差<sup>[9]</sup>。

本文采用乙腈为对照品溶液的溶剂, 建立了测定灭活狂犬病毒浓缩液中残留 $\beta$ -丙内酯的直接进样气相色谱法, 并对建立的方法进行了验证。结果表明, 该方法较已有文献方法<sup>[3, 9]</sup>操作简便, 可满足狂犬疫苗生产过程中残留 $\beta$ -丙内酯测定的需要, 为狂犬病疫苗生产工艺研究和验证工作提供了方法和手段, 并为生物制品研发中灭活工艺的研究提供了经验和借鉴。

## 1 材料

### 1.1 仪器

HP6890A气相色谱系统(美国Agilent公司); cp225D电子天平(德国Sartorius公司)。

### 1.2 药品与试剂

$\beta$ -丙内酯(对照品, 比利时Acros公司, 批号: A0226002, 纯度: 98%); 灭活狂犬病毒浓缩液[安泽康(北京)生物科技有限责任公司]

公司,批号:X20091009-1、X20091009-2、X20091009-3、X2009-1009-4,规格:每支均为1 ml,含6.67 mmol/L(病毒)];乙腈为色谱纯;水为超纯水。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

采用HP-DB624毛细管柱(30 m×0.32 mm×1.80 μm),程序升温:初始温度为80℃,保持1 min,以20℃/min的速率升温至200℃,保持5 min;检测器为氢火焰离子化检测器(FID),检测器温度为250℃;进样口温度为150℃;载气为氮气,流速为1.0 ml/min;进样量为1 μl。

### 2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液。精密称取β-丙内酯10.82 mg,置于10 ml量瓶中,加乙腈稀释至刻度,得到质量浓度为1 082.0 μg/ml的对照品溶液。精密量取上述对照品溶液适量,用乙腈依次稀释成质量浓度分别为504.1、108.2、50.41、10.82、1.082 μg/ml的系列对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液。灭活狂犬病毒浓缩液在4℃条件下,经10 000 r/min离心(离心半径4.9 cm)5 min后,取上清液立即测定。

### 2.3 方法专属性考察

2.3.1 溶剂对色谱系统分离情况的影响。在“2.1”项下色谱条件下,β-丙内酯保留时间约6.1 min,试验用溶剂(乙腈)保留时间约4.5 min。β-丙内酯与相邻最近色谱峰的分度大于4.0,β-丙内酯色谱峰理论板数>100 000,乙腈及灭活狂犬病毒浓缩液中均无干扰峰存在。表明本色谱条件的色谱分离能力可满足试验的需要。样品(批号:X20091009-1)及其添加β-丙内酯的乙腈溶液色谱图见图2。

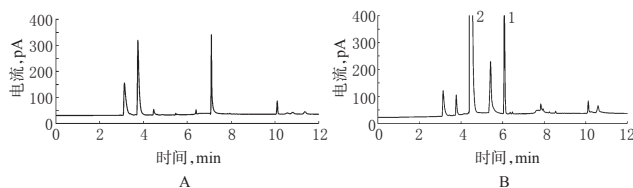


图2 气相色谱图

A. 样品; B. 样品+β-丙内酯的乙腈溶液; 1. β-丙内酯; 2. 乙腈

Fig 2 GC chromatograms

A. sample; B. sample+β-propiolactone acetonitrile solution; 1. β-propiolactone; 2. acetonitrile

2.3.2 β-丙内酯在不同溶液中保留时间的考察。取相同质量浓度β-丙内酯的乙腈溶液和添加有β-丙内酯的灭活狂犬病毒浓缩液分别进样3次,6次测定中β-丙内酯的保留时间分别为6.081、6.071、6.080、6.067、6.068、6.091 min,保留时间的RSD=0.15%(n=6)。表明在该色谱系统中,β-丙内酯在乙腈溶液和灭活狂犬病毒浓缩液中的色谱保留行为一致。

### 2.4 检测限和定量限试验

精密量取对照品溶液,逐步稀释,分别进样,调整检测灵敏度,按照信噪比为3:1确定β-丙内酯的检测限为0.2 ng,按照信噪比为10:1确定β-丙内酯的定量限为1.0 ng。

### 2.5 线性试验

取质量浓度分别为1 082.0、504.1、108.2、50.41、10.82、1.082 μg/ml的β-丙内酯对照品溶液进样测定,记录色谱图。以对照品溶液中β-丙内酯质量浓度(x)为横坐标,以峰面积(y)为

纵坐标,进行线性回归分析,得回归方程为: $y=0.8355x+2.3296$ ( $r=0.9994, n=6$ ),表明β-丙内酯的检测质量浓度线性范围为1.082~1 082.0 μg/ml。

### 2.6 精密度考察

取质量浓度为1.082 μg/ml的对照品溶液重复进样5次,记录峰面积。结果5次进样β-丙内酯保留时间的RSD=0.01%,峰面积的RSD=2.6%(n=5)。表明该色谱方法在线性范围最低限度水平上具有较好的精密度。

### 2.7 β-丙内酯在乙腈溶液中的稳定性考察

精密称取β-丙内酯12.63 mg,置于25 ml量瓶中,加乙腈稀释至刻度,室温条件下放置,于0、40、140、260、340、360 min时,分别取该溶液进样测定。结果峰面积的RSD=2.94%(n=6),表明β-丙内酯在乙腈溶液中室温条件下6 h能保持稳定。

### 2.8 方法耐用性考察

取对照品溶液分别在不同检测器温度(245、250、255℃)、不同进样口温度(145、150、155℃)条件下进行测定,记录色谱图。结果样品在不同检测器温度、不同进样口温度条件下测定,色谱峰面积的RSD分别为4.47%(n=3)、1.95%(n=3),均能满足测定要求,对测定结果无显著影响。

### 2.9 样品检测

按照建立的方法,对4批灭活狂犬病毒浓缩液中残留β-丙内酯进行测定,结果均未检出β-丙内酯。表明这4批样品中残留的β-丙内酯经37℃处理后已低于方法检测限。

## 3 讨论

β-丙内酯水溶液不稳定,且紫外吸收较弱,故笔者放弃了采用液相色谱方法。而目前《中国药典》中推荐的以顶空方式进样的残留溶剂检测方法需要进行加热平衡,会直接加速供试品溶液中残留β-丙内酯的水解,影响测定结果的准确性。因此最终确定以直接进样气相色谱法进行残留β-丙内酯的监控与测定。

现有文献<sup>[3,9]</sup>采用水作为溶剂配制对照品溶液,并储存在-20℃条件下备用,稀释用水需保持2~8℃,并且试验操作需要在冰盒上迅速操作,不但对操作要求较高且较为烦琐,同时温度的差异还容易影响结果的精密度和准确性,故笔者未采用此法。

本文采用乙腈作为对照溶液稀释溶剂,试验结果显示β-丙内酯在乙腈溶液中能够长时间保持稳定,并且β-丙内酯在乙腈溶液和灭活狂犬病毒浓缩液中具有相同的色谱行为,证实了乙腈对β-丙内酯的气相色谱测定无影响。由于采用乙腈作为溶剂,仅需在室温条件下制备和贮存对照品溶液,不需要在低温条件下进行迅速操作,因此大大降低了对试验条件和操作技术的要求。采用低温离心后的灭活狂犬病毒浓缩液作为供试品溶液,简单处理后立即进样,有效保证了试验结果的准确和可靠。

灭活狂犬病毒浓缩液的生产过程中设有“β-丙内酯消除”工艺,本研究是对β-丙内酯消除效果进行验证,属于限度性检查<sup>[10]</sup>,目标是灭活狂犬病毒浓缩液中不得检出残留的β-丙内酯。经试验验证,本方法操作简便、通用性强,在分离性能、检测灵敏度、线性范围、重复性和方法耐用性方面均可满足灭活狂犬病毒浓缩液中残留β-丙内酯检测的需要,为狂犬病疫苗生产工艺验证工作提供了方法和手段,并为其他生物制品研发

# RP-HPLC法检查利克飞龙片中的有关物质

王海玲<sup>1\*</sup>, 高海鹰<sup>1</sup>, 丁阳<sup>2</sup>(1.吉林省药物研究院, 长春 130060; 2.吉林大学白求恩医学部临床医学院, 长春 130021)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)25-2359-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.25.20

**摘要** 目的:建立利克飞龙片中有关物质的检查方法。方法:采用反相高效液相色谱法。色谱柱为Kromasil C<sub>18</sub>,流动相为乙腈-0.05%磷酸水溶液(60:40, V/V),流速为1.0 ml/min,检测波长为222 nm,柱温为25 ℃,进样量为10 μl;采用主成分自身对照法计算总杂质质量。结果:主峰与相邻峰的分离度良好,利克飞龙检测质量浓度线性范围为8.1~162 μg/ml( $r=0.9999$ ),检测限及定量限分别为0.25、0.89 ng;3批样品总杂质质量≤0.31%。结论:建立的方法灵敏度高、精密度好、专属性强,可用于利克飞龙片中有有关物质的检查。

**关键词** 利克飞龙片;有关物质;反相高效液相色谱法

## Determination of Related Substances in Licofelone Tablets by RP-HPLC

WANG Hai-ling<sup>1</sup>, GAO Hai-ying<sup>1</sup>, DING Yang<sup>2</sup>(1.Jilin Provincial Institute of Pharmaceutical Research, Changchun 130060, China; 2.School of Clinical Medicine, Norman Bethune Health Science Center of Jilin University, Changchun 130021, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish the method for the determination of the related substances in Licofelone tablets. METHOD: RP-HPLC method was adopted. The determination was performed on Kromasil C<sub>18</sub> column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.05% phosphate solution (60:40, V/V) at the flow rate of 1.0 ml/min; the detection wavelength was set at 222 nm and column temperature was 25 ℃. The injection volume was 10 μl. The total impurities was calculated by main component self contrast method. RESULTS: The main peak was well-separated from the adjacent peak. The linear range of licofelone were 8.1-162 μg/ml ( $r=0.9999$ ). The detection limit and quantitation limit were 0.25 ng and 0.89 ng, respectively. Total contents of impurities were lower than 0.31% in 3 batches of samples. CONCLUSIONS: The method is sensitive, precise and specific, and can be used to determine the related substances in Licofelone tablets.

**KEYWORDS** Licofelone tablets; Related substances; RP-HPLC

非甾体类消炎镇痛药是全球处方量最大的药物之一<sup>[1]</sup>,主要通过抑制环氧合酶发挥镇痛作用,但具有胃肠道、心血管等

方面的不良反应<sup>[2]</sup>。利克飞龙是一种环氧合酶、5-脂氧合酶双重抑制药,是具有双重抗炎作用<sup>[3]</sup>的新型非甾体类消炎镇痛

中残留β-丙内酯的检测提供了经验和借鉴。

## 参考文献

- [1] Lawrence SA. β-propiolactone: viral inactivation in vaccines and plasma products[J]. *PDA J Pharm Sci Technol*, 2000, 54(3):209.
- [2] Perrin P, Morgeaux S. Inactivation of DNA by beta-propiolactone[J]. *Biologicals*, 1995, 23(3):207.
- [3] 杨健, 高军, 张庆义, 等. β-丙内酯含量气相色谱检测方法的建立及其水解情况分析[J]. *中国生物制品学杂志*, 2010, 23(3):323.
- [4] National Toxicology Program. Department of Health and Human Services. β-Propiolactone[DB/OL].[2014-02-12]. <http://ntp.niehs.nih.gov/go/roc12>.
- [5] 张玉慧, 高春润, 潘广域, 等. Vero 细胞人用狂犬病疫苗
- [6] 陈伟, 李忠义, 刘江秋, 等. β-丙内酯在 Vero 细胞 HFRS 疫苗中的应用[J]. *中国公共卫生*, 2003, 19(6):669.
- [7] 李福安, 窦志勇, 潘丽静. 狂犬疫苗灭活后 β-丙内酯水解的最佳 pH 值的选择[J]. *中国公共卫生*, 1999, 15(11):964.
- [8] 刘兆文, 李福安, 钱浩. β-丙内酯在人用纯化地鼠肾细胞狂犬疫苗制备中的应用研究[J]. *中国人兽共患病杂志*, 1999, 15(6):71.
- [9] 徐英, 魏然, 姜英, 等. 气相色谱法对轮状病毒疫苗中 β-丙内酯测定的研究[J]. *微生物学免疫学进展*, 2010, 38(3):21.
- [10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:二部[S]. 2010年版. 北京:中国医药科技出版社, 2010:附录 194.

\* 助理研究员。研究方向:药物分析。E-mail:2585688655@qq.com

(收稿日期:2013-09-23 修回日期:2014-02-21)