

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2017.5.05

避免疫苗中有色物质干扰的甲醛残留量测定法

于晓辉, 马秋冉, 张璐, 董玲玲, 戴青, 杨秀玉*

(中国兽医药品监察所, 北京 100081)

[收稿日期] 2016-11-25 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2017) 05-0022-06 [中图分类号] S859.797

[摘要] 建立了一种能有效避免疫苗中有色物质干扰的甲醛残留量测定法。采用乙酰丙酮分光光度法, 利用“本底扣除”的方式, 在 410 nm 波长处对疫苗中甲醛的残留量进行测定。结果显示, 酚红、中性红等有色物质均不会对测定结果产生干扰; 在 0.002~0.2 mg/mL 范围内, 吸光度与浓度呈良好的线性关系 ($r=0.9999, n=7$); 在 0.005、0.05、0.15 mg/mL 三种添加浓度下, 该方法的平均回收率分别为 110.5%、97.5% 和 101.3%; 对 24 批含有有色物质的疫苗进行测定, 所得结果与专属性较强的 HPLC 法一致。该方法专属性强、准确度高、适用范围宽, 可以作为疫苗中甲醛残留量的检测方法。

[关键词] 甲醛; 疫苗; 有色物质干扰; 分光光度法

Detection of Free Formaldehyde in Vaccines Avoiding Interference from Colored-Substances

YU Xiao-hui, MA Qiu-ran, ZHANG Lu, DONG Ling-ling, DAI Qing, YANG Xiu-yu*

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Corresponding author: YANG Xiu-yu, E-mail: yxyyang0903@163.com

Abstract: To establish a method for the detection of free formaldehyde in vaccines that can avoid the interference from colored substances, the analysis was performed by acetyl acetone spectrophotometric method with the means of "deducting background" at 410 nm. Phenol red and neutral red did not interfere with the result; the linearity range was 0.002~0.2 mg/mL ($r=0.9999, n=7$), and under 0.005, 0.05, 0.15 mg/mL levels of accession, the average recoveries were respectively 108.6%, 97.5% and 101.3%; 24 batches of sample were detected by the new established method, and the results were in agreement with HPLC. The method is characterized by good specificity and accuracy with wide adaptive range. It can be used for the formaldehyde detection in vaccines.

Key words: formaldehyde; vaccines; colored-substance interference; spectrophotometry

甲醛溶液作为灭活剂被广泛应用于兽用疫苗的生产中, 由于其具有致癌性和致畸性, 因而必须

对制剂中游离甲醛的含量进行准确控制, 以提高产品的安全性, 进而保证动物源性食品的安全性。目

作者简介: 于晓辉, 硕士, 副研究员, 从事兽药检测工作。

通讯作者: 杨秀玉, E-mail: yxyyang0903@163.com

前,国内兽用疫苗甲醛残留量测定的法定标准是《中国兽药典》^[1]三部,该标准中明确规定“本法仅适用于不含酚红的产品”,即该方法无法准确测定含有酚红的疫苗中甲醛的残留量,主要是因为该方法的测定波长是在可见光区,疫苗中含有的酚红会在测定波长处(410 nm)产生吸收,使得最终的测定结果偏高,造成测定不准确。经查阅得知,现行《中国药典》^[2]、《美国药典》^[3]、《欧洲药典》^[4]和《英国药典》^[5]中甲醛残留量的测定波长均在可见光区,且测定方法中均未就如何避免疫苗中有色物质

的干扰给出明确的操作建议。

1 材 料

1.1 主要仪器 紫外-可见分光光度计: TU1901, 北京普析通用仪器有限责任公司; 电子天平: AE240, 瑞士 METTLER-TOLEDO 公司; 恒温水浴锅: DK-S22 型, 上海精宏实验设备有限公司。

1.2 主要试剂 甲醛对照品溶液: 国药集团化学试剂有限公司(经标定其含量为 37.0%); 水为纯化水; 其余试剂均为分析纯。供试疫苗样品的相关信息见表 1(供试疫苗均以编号表示)。

表 1 供试疫苗样品信息
Tab 1 Information of tested vaccines

编号 Number	疫苗名称 Vaccine name	生产批号 Lot number	颜色 Color
1	狂犬病灭活疫苗(SAD 株)	201509033	粉红色
2	狂犬病灭活疫苗(SAD 株)	201509034	粉红色
3	狂犬病灭活疫苗(SAD 株)	201509035	粉红色
4	狂犬病灭活疫苗(CVS-11 株)	20141201	淡粉色
5	狂犬病灭活疫苗(CVS-11 株)	20141202	淡粉色
6	狂犬病灭活疫苗(CVS-11 株)	20141203	淡粉色
7	山羊传染性胸膜肺炎灭活疫苗	20141003	深棕色
8	羊败血性链球菌病灭活疫苗	153703	淡黄色
9	猪支原体肺炎灭活疫苗	2015003	淡黄色
10	猪圆环病毒 2 型灭活疫苗	2015003	淡粉色
11	牛多杀性巴氏杆菌病灭活疫苗	2015003	淡黄色
12	狂犬病灭活疫苗(SAD 株)	201501030	粉红色
13	狂犬病灭活疫苗(SAD 株)	201501031	粉红色
14	狂犬病灭活疫苗(SAD 株)	201501032	粉红色
15	猪圆环病毒 2 型灭活疫苗(DBN-SX07 株)	201503003	淡粉色
16	狂犬病灭活疫苗(CVS-11 株)	20150801	淡粉色
17	狂犬病灭活疫苗(CVS-11 株)	20150802	淡粉色
18	狂犬病灭活疫苗(CVS-11 株)	20150803	淡粉色
19	猪丹毒、多杀性巴氏杆菌病二联灭活疫苗	153603	浅棕色
20	猪丹毒灭活疫苗	153403	浅棕色
21	猪多杀性巴氏杆菌病灭活疫苗	153503	浅棕色
22	狂犬病灭活疫苗(SAD 株)	140703	粉红色
23	小鹅瘟精制蛋黄抗体	20141001	淡黄色
24	小鹅瘟精制蛋黄抗体	20141003	淡黄色

2 方法与结果

2.1 溶液制备 乙酰丙酮试液:量取乙酰丙酮 7.0 mL,加乙醇 14 mL,混匀,加水至 1000 mL。醋酸-醋酸铵缓冲液:量取醋酸 5.2 mL,加水至 40 mL;称取醋酸铵 173.4 g,加水至 1000 mL,使溶解;将上述两种溶液混匀,即得。对照储备液:精密称定甲醛对照品溶液约 140 mg,置于 50 mL 量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,即得每 1 mL 含甲醛 1.0 mg 的对照储备液。对照溶液:精密量取对照储备液 5 mL,置 50 mL 量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀。供试溶液:量取被测疫苗样品 5.0 mL,置 50 mL 量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀。

2.2 实验方法 步骤 1:分别量取对照溶液、供试溶液、水各 0.5 mL,置具塞试管中,加醋酸-醋酸铵缓冲液 10 mL,乙酰丙酮试液 10 mL,置 60 ℃ 水浴 15 min,冷水冷却 5 min,放置 20 min 后,以空气为参比,在 410 nm 的波长处测定吸光度,即得 $A_{\text{对照}}$ 、 $A_{\text{供试}}$ 、 $A_{\text{空白-1}}$ 。步骤 2:分别量取供试溶液和水各 0.5 mL,置具塞试管中,加醋酸-醋酸铵缓冲液 20 mL,置 60 ℃ 水浴 15 min,冷水冷却 5 min,放置 20 min 后,以空气为参比,在 410 nm 的波长处测定吸光度,即得 $A_{\text{本底}}$ 、 $A_{\text{空白-2}}$ 。

2.3 计算方法 根据 Lambert-Beer 定律和吸光度具有可加和性的特性得知,待测溶液的总吸光度等于溶液中各组分吸光度之和,即:

$$A_{\text{供试}} = \text{样品中甲醛吸光度} + \text{样品本底吸光度} + \text{乙酰丙酮吸光度} + 10 \text{ mL 缓冲液吸光度} \quad (1)$$

$$A_{\text{本底}} = \text{样品本底吸光度} + 20 \text{ mL 缓冲液吸光度} \quad (2)$$

$$A_{\text{对照}} = \text{对照液中甲醛吸光度} + 0.5 \text{ mL 水的吸光度} + \text{乙酰丙酮吸光度} + 10 \text{ mL 缓冲液吸光度} \quad (3)$$

$$A_{\text{空白-1}} = 0.5 \text{ mL 水的吸光度} + \text{乙酰丙酮吸光度} + 10 \text{ mL 缓冲液吸光度} \quad (4)$$

$$A_{\text{空白-2}} = 0.5 \text{ mL 水的吸光度} + 20 \text{ mL 缓冲液吸光度} \quad (5)$$

将式(1)、式(2)与式(3)、式(4)两两合并同类项加减,得到:

$$A_{\text{供试}} - A_{\text{本底}} = \text{样品中甲醛吸光度} + \text{乙酰丙酮吸光度} - 10 \text{ mL 缓冲液吸光度} \quad (6)$$

$$A_{\text{空白-1}} - A_{\text{空白-2}} = \text{乙酰丙酮吸光度} - 10 \text{ mL 缓冲液吸光度} \quad (7)$$

将式(6)、式(7)合并同类项加减,即得:

样品中甲醛吸光度 = $A_{\text{供试}} - A_{\text{本底}} - (A_{\text{空白-1}} - A_{\text{空白-2}})$,

同理,对照液中甲醛吸光度 = $A_{\text{对照}} - A_{\text{空白-1}}$,所以,样品中甲醛含量 = $\frac{A_{\text{供试}} - A_{\text{本底}} - (A_{\text{空白-1}} - A_{\text{空白-2}})}{A_{\text{对照}} - A_{\text{空白-1}}}$ 。

2.4 专属性 本研究采用的方法是乙酰丙酮法,即甲醛和显色剂乙酰丙酮在 pH 值约为 6 的环境下,迅速生成稳定的黄色化合物。该法选择性强,共存的其他化合物不易参与反应。酚红和中性红作为指示剂,经常用于培养基和细胞维持液的制备中,成为疫苗颜色的主要来源。焦亚硫酸钠作为灭活阻断剂,也会用于疫苗生产过程中。

本研究以酚红、中性红和焦亚硫酸钠为考察对象,验证了这三种化合物均不会参与甲醛与乙酰丙酮的反应,即这些化合物产生的干扰都可以通过“本底扣除”的方式抵消。具体实验过程如下:分别配制 0.02% 酚红溶液、0.002% 酚红溶液、0.1% 中性红溶液和 0.4% 焦亚硫酸钠溶液,按照 2.2 项中的步骤 1 和步骤 2 操作,即得 A_1 和 A_2 ,具体结果见表 2。

根据表 2 的结果得知,当反应液中含有乙酰丙酮时(步骤 1),酚红、中性红、焦亚硫酸钠的吸光度值与不含乙酰丙酮时(步骤 2)的吸光度值几乎完全一致,表明这三种化合物的吸光度值均为自由颜色吸收,不是与乙酰丙酮反应的结果,即这三种化合物均不会参与甲醛与乙酰丙酮的反应,它们产生的干扰可以通过“本底扣除”的方式抵消。实验结果证明,该方法的专属性良好。

表 2 专属性验证结果
Tab 2 Results of specificity

	0.02% 酚红 0.02% Phenol red	0.002% 酚红 0.002% Phenol red	0.1% 中性红 0.1% Neutral red	0.4% 焦亚硫酸钠 0.4% Sodium metabisulfite
A_1 (步骤 1)	0.292	0.030	0.242	0.000
A_2 (步骤 2)	0.290	0.030	0.241	0.000

2.5 线性、范围及定量限 量取 2.1 项下的对照储备液适量,用水稀释,制得浓度为 0.0005、0.001、

0.002、0.005、0.01、0.02、0.05、0.1、0.2、0.3 mg/mL 的对照溶液,按照 2.2 项下的方法操作,测定吸光度值,以浓度 X 对吸光度 Y 作图(图 1),得到甲醛的线性回归方程为 $Y = 6.7497X - 0.0081$ ($r = 0.9999$, $n = 7$),线性范围为 0.002~0.2 mg/mL。

实验结果表明,当对照溶液浓度大于等于 0.3 mg/mL 时,吸光度值不稳定,无法准确测定。当对照溶液浓度小于等于 0.001 mg/mL 时,吸光度值小于 $A_{空白-1}$,所以,本法的定量限为 0.002 mg/mL。

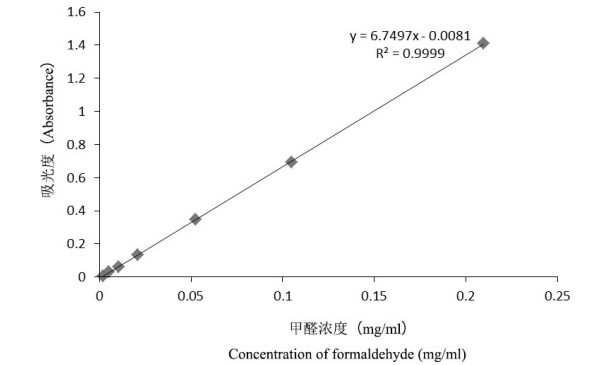


图 1 甲醛线性关系图

Fig 1 Linear relationship of formaldehyde

2.6 回收率 以 22 号样品为考察对象,向其中添加浓度为 0.005、0.05、0.15 mg/mL 的甲醛对照溶液,每种浓度平行制备 3 份样品,按照 2.2 项下的方法操作,测定吸光度值,按照 2.3 项下的方法计算,结果见表 3。

根据表 3 的结果得知,在 0.005、0.05、0.15 mg/mL 三种添加水平下,该方法的回收率在

96.95%~116.19% 之间,结果令人满意,表明方法的准确度良好。

2.7 精密度和溶液稳定性 量取对照储备液适量,分别配制浓度为 0.005 mg/mL 和 0.02 mg/mL 的甲醛对照溶液,每种浓度各配制 5 份,按照 2.2 项下的方法操作,测定吸光度值。结果,浓度为 0.005 mg/mL 时, $RSD = 1.8\%$; 浓度为 0.02 mg/mL 时, $RSD = 0.3\%$,表明方法的精密度良好。

取上述两种浓度的对照溶液,分别于 0、0.5、1.5、3.5 h,按照 2.2 项下的方法操作,测定吸光度值。结果表明,两种浓度下,吸光度值的 RSD 分别为 0.2% 和 0.1%。实验表明,溶液在 3.5 h 内保持稳定。

2.8 方法应用 按照 2.2 项下的方法,对 24 批含有有色物质的疫苗进行测定,并将测定结果与已经经过验证的高效液相色谱法^[6] 进行比较,结果见表 4。

从上述测定结果得知,本研究新建立的甲醛残留量测定法的测定结果,与经过验证的高效液相色谱法的测定结果几乎完全一致;新建方法设定了定量限,保证了测定结果更客观。现行《中国兽药典》中甲醛残留量测定法的测定结果均比新建方法高,其中,偏差最大的甚至高达 228%,这其中的原因主要是因为疫苗中的有色物质对测定结果产生了干扰,尤其当疫苗中甲醛含量较低时,干扰就更显著。

3 讨论与小结

本研究 2.2 项下步骤 1 的操作源自现行版《中国兽药典》三部,而步骤 2 中的方法则是本研究的创新点,即通过只添加缓冲液、不添加显色剂乙酰丙酮,得到供试疫苗本底吸光度值。为了保证步骤 1

表 3 回收率测定结果
Tab 3 Results of recoveries

添加量/mg Additive amount	吸光度值 Absorbance	测得量/mg Tested amount	回收率/% Recovery	平均回收率/% Average recovery	RSD/% (n=3)
0.00525	0.076	0.0058	110.48	110.5	5.2
	0.074	0.0055	104.76		
	0.078	0.0061	116.19		
0.0525	0.383	0.0513	97.71	97.5	0.5
	0.384	0.0514	97.90		
	0.380	0.0509	96.95		
0.1575	1.113	0.1596	101.33	101.3	0.2
	1.110	0.1592	101.08		
	1.115	0.1599	101.52		

表 4 24 批疫苗样品测定结果

Tab 4 Results of 24 batches of vaccines

样品编号 Number	UV-新/(mg · mL ⁻¹) UV-new/(mg · mL ⁻¹)	UV-原/(mg · mL ⁻¹) UV-original/(mg · mL ⁻¹)	HPLC/(mg · mL ⁻¹)
1	ND	0.026	ND
2	ND	0.017	ND
3	ND	0.011	ND
4	ND	0.008	ND
5	ND	0.014	ND
6	ND	0.014	ND
7	ND	0.089	ND
8	0.111	0.164	0.087
9	0.039	0.114	0.043
10	0.210	0.222	0.210
11	ND	0.014	ND
12	ND	0.020	ND
13	ND	0.014	ND
14	ND	0.023	ND
15	0.22	0.231	0.230
16	ND	0.011	ND
17	ND	0.006	ND
18	ND	0.006	ND
19	0.092	0.170	0.073
20	0.322	0.372	0.330
21	0.032	0.105	0.035
22	ND	0.017	ND
23	0.021	0.041	0.021
24	ND	0.033	ND

UV-新:本研究新建立的甲醛残留量测定法;UV-原:《中国兽药典》^[1]中甲醛残留量测定法;ND:低于方法的定量限。

和步骤 2 中制备的溶液体积一致(即浓度一致),步骤 2 中缓冲液的加入量为 20 mL。本研究对现行《中国兽药典》中甲醛残留量的测定方法进行了改进,应用新建的方法对 24 批含有酚红等多种有色物质的疫苗进行了测定,并将测定结果与专属性较强的高效液相色谱法^[6]进行了比较和验证。本研究创新采用了“本底扣除”的检测技术成功解决了疫苗中有色物质干扰测定结果的问题。经文献查阅得知,目前国内外尚未见应用该方法测定疫苗中甲醛残留量的相关报道。相比于 HPLC 法,“本底扣除”的方法不但结果准确,而且操作简便、成本低廉。

通过上述实验得知,本研究建立的方法专属性强、准确度高,可以作为各类疫苗(含有色物质疫苗

和不含有色物质疫苗)中甲醛残留量的测定方法。本研究为扩大现行《中国兽药典》的适用范围提供了有力的技术支持,也为更好的控制兽用疫苗质量提供了可靠的实验依据。

参考文献:

[1] 中国兽药典委员会.中华人民共和国兽药典.三部[M].北京:中国农业出版社,2010.
Commission of Chinese veterinary pharmacopoeia. Veterinary Pharmacopoeia of the People's Republic of China. Volume III [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2010.

[2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典.二部[M].北京:中国医药科技出版社,2010.
Commission of Chinese pharmacopoeia. Pharmacopoeia of the

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2017.5.06

HPLC 法同时测定连花柴芩可溶性粉中 4 种有效成分含量

张丽先¹, 魏悦¹, 曹静亚¹, 王志尧², 王学方², 李晓^{2*}

(1. 河南科高中标检测技术有限公司, 郑州 450002; 2. 河南省科高植物天然产物开发工程技术有限公司, 郑州 450002)

[收稿日期] 2016-11-25 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2017) 05-0027-06 [中图分类号] S859.2

[摘要] 建立了 HPLC 法同时测定连花柴芩可溶性粉中绿原酸、甘草苷、连翘酯苷 A 及黄芩苷的含量。采用 Venusil XBP C18 分析柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以乙腈~0.1% 磷酸水为流动相, 1.0 mL/min 的流速下进行梯度洗脱, 320 nm 波长处对 4 种成分进行含量测定。结果表明, 在此色谱条件下, 4 种组分分离度良好, 分别在 3.28~26.24 μg/mL、3.17~25.36 μg/mL、6.08~48.64 μg/mL 及 8.81~70.48 μg/mL 范围内线性关系良好, 加样回收率均大于 96.61 %, RSD 均小于 1.75 %。该方法简便、快速、准确, 重复性良好, 可用于连花柴芩可溶性粉中绿原酸、甘草苷、连翘酯苷 A 及黄芩苷的同时测定。

[关键词] 连花柴芩可溶性粉; 含量测定; 高效液相色谱法

Simultaneous Determination of Four Active Components in Lian-hua-chai-qin Soluble Power by HPLC

ZHANG Li-xian¹, WEI Yue¹, CAO Jing-ya¹, WANG Zhi-yao², WANG Xue-fang², LI Xiao^{2*}

(1. Cogotesting International Company Limited, Zhengzhou 450000, China;

2. Henan Plant Natural-Products Development Engineering Technology Company, Zhengzhou 450002, China)

Corresponding author: LI Xiao E-mail: 67430218@qq.com

Abstract: A new HPLC method was firstly established for simultaneous determination of caffeotannic acid,

基金项目: 河南省科技攻关项目 (152102110115)

作者简介: 张丽先, 硕士, 从事中药质量控制研究。

通讯作者: 李晓。E-mail: 67430218@qq.com

People's Republic of China. Volume II [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2010.

[3] The United States Pharmacopeial Convention. U.S.P38-NF33 [S].

[4] European Pharmacopoeia Commission. EP 8 [S].

[5] British Pharmacopoeia Commission. BP 2015 [S].

[6] 马秋冉, 张璐, 戴青, 等. 柱前衍生化-高效液相色谱法检测疫苗中游离甲醛含量[J]. 中国兽药杂志. 2016, 50(8): 20-23.

Ma Q R, Zhang L, Dai Q, et.al. Determination of Free Formaldehyde Content in Vaccine by Pre-column Derivatization HPLC [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2016, 50(8): 20-23.

(编辑: 侯向辉)