

高效液相色谱法测定流感病毒裂解疫苗中 Triton X-100 的含量

董洁 潘若文 范有党 林小军 张勇朝

(华兰生物疫苗有限公司 新乡 453003)

摘要 目的: 建立流感病毒裂解疫苗中裂解剂 Triton X-100 含量的 HPLC 法。方法: 采用 SymmetryShield™ RP₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm 5 μm), 以注射用水-无水甲醇 (20:80) 为流动相, 流速为 1.5 mL · min⁻¹, 柱温为 25 °C, 检测波长为 230 nm, 进样量为 10 μL, 用面积归一法测定。结果: Triton X-100 在 625 ~ 39 μg · mL⁻¹ 范围内线性关系良好 ($r=0.9994$), 流感病毒裂解疫苗原液平均加样回收率为 107.7%, RSD 为 0.3%; 流感病毒裂解疫苗平均加样回收率为 108.5%, RSD 为 0.4%。结论: 本方法灵敏度高, 操作简便可靠。

关键词: 高效液相色谱法; 裂解剂; Triton X-100; 流感病毒裂解疫苗

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2011)11-2174-02

HPLC determination of triton X-100 in (Split ,Inactivated) Influenza Vaccine

DONG Jie ,PAN Ruo-wen ,FAN You-dang ,LIN Xiao-jun ,ZHANG Yong-chao

(Hualan biological bacterin CO. ,LTD. ,Xingxiang 453003 ,China)

Abstract Objective: To establish a method for the determination of Triton X-100 in Influenza Vaccine (Split , Inactivated) by HPLC. **Method:** A Waters SymmetryShield™ RP₁₈ column (4.6 mm × 250 mm 5 μm) was used with the mobile phase of injection water - methanol (20:80) at flow rate of 1.5 mL · min⁻¹. The column temperature was 25 °C and the UV detection wavelength was 230 nm. **Results:** The Triton X-100 curve was linear in the range of 625 to 39 μg · mL⁻¹ ($r=0.9994$). The average recovery of Triton X-100 in Influenza Vaccine bulk was 107.7% (RSD = 0.3%). The average recovery of Triton X-100 in Influenza Vaccine was 108.5% (RSD = 0.4%). **Conclusion:** The method is high sensitivity ,simple and accurate.

Key words: HPLC; split agent; Triton X-100; Influenza Vaccine (Split ,Inactivated)

Triton X-100 是 1 种非离子型表面活性剂(或称去污剂) ,能溶解脂质,是目前季节性流感病毒裂解疫苗中最常用的裂解剂。2010 年版中国药典对其残留量进行了明确规定^[1],但目前还没有统一的方法对其残留量进行测定,本文旨在建立测定流感病毒裂解疫苗中 Triton X-100 含量测定的高效液相色谱法,为生产企业、研发单位及药检机构提供参考。

1 仪器与试剂

高效液相色谱仪: 日本岛津 1050 ,SPD-20A 紫外检测仪、工作站; 流感病毒裂解疫苗(华兰生物疫苗有限公司,批号 200906A01) ,流感病毒裂解疫苗原液(华兰生物疫苗有限公司,批号 B2-A201103019) ,Triton X-100 对照品(Sigma 公司,批

号 118K0160) ;无水甲醇为色谱纯(天津市化学试剂三厂) ,水为注射用水,其他试剂均为分析纯。所用仪器和量具均经检定和校正。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备 精密称取 Triton X-100 对照品 10 g,置 100 mL 量瓶中,加温热的注射用水适量,溶解,并稀释至刻度,做为对照品储备液。精密量取对照品储备液 2.5 mL,置 100 mL 量瓶中,用注射用水稀释至刻度,摇匀,即为 2500 μg · mL⁻¹,经 0.45 μm 滤膜滤过,即得。

2.2 色谱条件及系统适应性试验^[2,3] 色谱柱: SymmetryShield™ RP₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm 5 μm) ;流动相: 无水甲醇 800 mL,用水稀释至 1000

mL; 检测波长: 230 nm; 柱温为 25 °C; 流速: 1.5 mL · min⁻¹; 进样量 10 μL。在此色谱条件下, 用精密制备含 Triton X-100 (156.25 μg · mL⁻¹) 的溶液, 进样 10 μL, 记录色谱图(图 1), 出峰时间为 5.42 min, 理论板数为 3900。

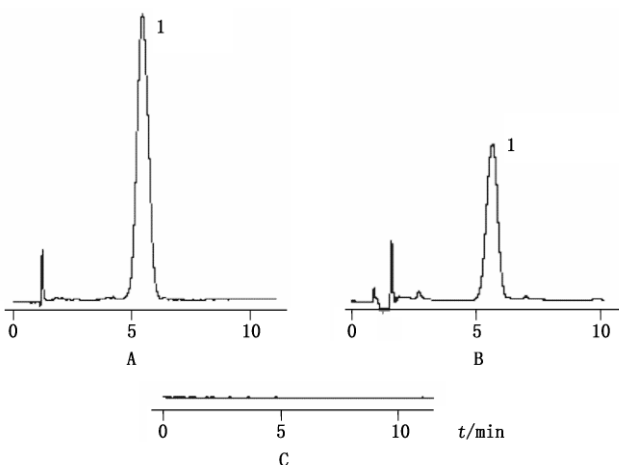


图 1 对照溶液(A)、供试品溶液(流感病毒裂解疫苗)(B)、空白溶液(C)色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of reference substance(A), sample(Influenza Vaccine)(B) and blank(C)

1. Triton X-100

2.3 线性关系考察 取对照品溶液 1 mL, 倍比稀释成 1250, 625, 312.5, 156.25, 78.125, 39.0625, 19.53 μg · mL⁻¹ 的系列溶液, 按上述色谱条件和测定方法各进样 10 μL, 进行测定。结果表明, 在 625-39 μg · mL⁻¹ 浓度范围内呈良好线性, 分别以 Triton X-100 的浓度 X (μg · mL⁻¹) 为横坐标, 峰面积 Y 为纵坐标, 回归方程为:

$$Y = 5302X + 27127 \quad r = 0.9994$$

2.4 准确度试验

2.4.1 流感病毒裂解疫苗原液加样回收率 分别精密吸取上述对照品溶液 (312.5 μg · mL⁻¹) 2.0 mL, 共 3 份, 再分别精密加入已知浓度 (770.4 μg · mL⁻¹) 的疫苗原液 2.0 mL, 摇匀。每个样品按上述色谱条件和测定方法进行测定。Triton X-100 的加样回收率分别为 108.1%, 107.7%, 107.4%, 平均加样回收率为 107.7%, RSD 为 0.3%。

2.4.2 流感病毒裂解疫苗加样回收率试验 分别精密吸取上述对照品溶液 (156.25 μg · mL⁻¹) 2.0 mL, 共 3 份, 再分别精密加入已知浓度 (48.8 μg · mL⁻¹) 的样品溶液 2.0 mL, 摇匀。每个样品按上述色谱条件和测定方法进行测定。Triton X-100 的加样回收率分别为 108.6%, 108.9%, 108.0%, 平均加样回收率为 108.5%, RSD 为 0.4%。

2.5 精密度试验 取对照品溶液 (156.25 μg · mL⁻¹) 10 μL, 按上述色谱条件和测定方法连续进样 6 次, 测定 Triton X-100 的峰面积, RSD 为 0.50%。

2.6 重复性试验 取 1 批流感病毒裂解疫苗 6 份, 按上述色谱条件和测定方法连续进样, 测定 Triton X-100 的峰面积, RSD 为 1.05%。

2.7 样品测定

2.7.1 流感病毒裂解疫苗 Triton X-100 含量测定

取流感病毒裂解疫苗按本文方法, 用各峰面积的面积归一法计算该批中 Triton X-100 的含量, 重复 3 次结果分别为 48.56, 49.67, 48.64 μg · mL⁻¹; RSD 为 1.3%。

2.7.2 流感病毒裂解疫苗原液 Triton X-100 含量测定 取流感病毒裂解疫苗原液稀释 10 倍后按本文方法, 用各峰面积的面积归一法计算该批中 Triton X-100 的含量, 重复 3 次结果分别为 769.7, 771.0, 770.6 μg · mL⁻¹; RSD 为 0.7%。

3 讨论

3.1 Triton X-100 是一种非离子型表面活性剂, 其聚集体能够溶解细胞壁上的蛋白质, 因而具有破碎细胞壁的能力^[4]。其浓度达到 0.1% 时能破坏生物膜, 使细胞及其内的细胞器溶解破坏^[5]。一定浓度的 Triton X-100 还可以引起人体过敏反应。因此, 其作为流感病毒裂解疫苗中的裂解剂, 必须严格控制其残留量。

3.2 因 Triton X-100 粘度大, 样品稀释至 ppm 数量级为好。 本次试验中使用的流感病毒裂解疫苗原液蛋白含量为 375 μg · mL⁻¹ 对 Triton X-100 的干扰很小。因此采用普通的 C₁₈ 色谱柱完全可以满足要求。

参考文献

- 1 ChP(中国药典). 2010. Vol III(三部): 163
- 2 SHAO Qiu-yan(邵秋霞), WANG Mo-zheng(汪模正), CHEN Xiang-song(陈祥松). HPLC determination of Triton X-100 in Fibrinogen(应用液相色谱法测定纤原中 Triton X-100 含量). *Chin J Biological*(中国生物制品学杂志) 2002, 15(1): 49
- 3 YANG Peng-yun(杨鹏云), CHENG Ya-qin(程雅琴). Determination of Triton X-100 methods is established in plasma products(血浆制品中 Triton X-100 残留量测定方法的建立). *Chin J Biological*(中国生物制品学杂志) 2003, 16(4): 235
- 4 GU Qi-feng(顾其丰). *Biochemical Engineering*(生物化学工程). Beijing(北京): Science Press(科学出版社), 1995. 136
- 5 ZUO Jin-hua(左金华), XU Hui-ying(徐慧英), YANG You-cheng(杨佑成). Triton X-100 on the preparation of acellular dermal matrix in rats(Triton X-100 对制备脱细胞真皮基质影响的实验研究). *Shandong Medical J*(山东医药) 2005, 45(11): 11

(本文于 2010 年 11 月 22 日收到)