

HPLC 法测定人用皮卡狂犬病疫苗和皮卡佐剂中硫酸卡那霉素的含量

薛晶¹ 崔学文² 胡昌勤^{1*}

(1. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050; 2. 四川省食品药品检验所, 成都 610036)

摘要 目的: 建立测定人用皮卡狂犬病疫苗和皮卡佐剂中硫酸卡那霉素含量的 HPLC 方法。方法: 色谱柱为 CAPCELL PAK C₈ DD(4.6 mm×250 mm 5 μm); 流动相为磷酸二氢钾缓冲液(0.02 mol·L⁻¹, pH 7.5) - 甲醇 - 乙腈(23:7:40); 流速为 1.0 mL·min⁻¹; 柱温为 45 ℃; 采用柱前衍生化法, 衍生化试剂为 2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS); 检测波长为 350 nm。结果: 在 0.01~1.0 mg·mL⁻¹ 范围内, 硫酸卡那霉素的浓度与峰面积呈现良好的线性关系($A = 3 \times 10^6 C - 3313.9$, $r = 1.000$, $n = 7$); 在 80%、100%、120% 3 个浓度下的平均回收率($n = 3$) 分别为 82.5% (RSD = 1.6%), 90.3% (RSD = 2.0%), 81.6% (RSD = 1.8%); 方法的最低检测限为 0.41 μg·mL⁻¹; 最低定量限为 1.39 μg·mL⁻¹; 供试品溶液在 8 h 内稳定(RSD = 1.1%)。结论: 本方法准确、快速、通用性良好。

关键词: 狂犬病疫苗; 皮卡佐剂; 硫酸卡那霉素; 生物制品; 抗生素残留; 高效液相色谱法

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2011)10-1911-03

HPLC determination of kanamycin sulfate in PIKA rabies vaccine for human use and PIKA adjuvant

XUE Jing¹, CUI Xue-wen², HU Chang-qin^{1*}

(1. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China;

2. Sichuan Provincial Institute for Food and Drug Control, Chengdu 610036, China)

Abstract Objective: To establish an HPLC method for determining the content of kanamycin sulfate in PIKA rabies vaccine for human use and PIKA adjuvant. **Methods:** A C₈ column (CAPCELL PAK C₈ DD 4.6 mm×250 mm, 5 μm) was used, and the mobile phase was 0.02 mol·L⁻¹ of potassium dihydrogen phosphate (adjusted with 1 mol·L⁻¹ of potassium hydroxide to pH 7.5) - methanol - acetonitrile (23:7:40). The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, and the column temperature was kept at 45 ℃. The method was based on a pre-column derivatization of kanamycin sulfate with a 2,4,6-trinitrobenzenesulphonic acid reagent and the detection wavelength was set at 350 nm. **Results:** The linear range was 0.01 - 1.0 mg·mL⁻¹, $A = 3 \times 10^6 C - 3313.9$, $r = 1.000$ ($n = 7$). The average recoveries at the concentration of about 80%, 100% and 120% were 82.5% ($n = 3$, RSD = 1.6%), 90.3% ($n = 3$, RSD = 2.0%) and 81.6% ($n = 3$, RSD = 1.8%), respectively. The LOD was 0.41 μg·mL⁻¹ and the LOQ was 1.39 μg·mL⁻¹. The sample solution was stable for at least eight hours (RSD = 1.1%). **Conclusion:** The method is accurate, rapid and can be used widely.

Key words: PIKA rabies vaccine for human use; PIKA adjuvant; kanamycin sulfate; biological products; antibiotic residue; HPLC

我国目前使用的人用狂犬病疫苗多是无佐剂疫苗, 效价低且需要浓缩, 而浓缩后的疫苗对人体的副作用较大。使用皮卡作为人用狂犬病疫苗的佐剂, 能够明显促进免疫细胞的增殖, 促进 IL-2 的生成, 用于病毒感染前的免疫可提高效价 5~10 倍, 并能显著提高 IgG 和中和抗体滴度^[1]。

皮卡的化学本质是双链 RNA, 也叫聚肌胞, 是

我国研制开发的 1 种疫苗佐剂。它是聚次黄嘌呤核苷酸、聚胞嘧啶核苷酸、卡那霉素和氯化钙几种成分的结合物, 其中的卡那霉素作为带正电荷的多胺基化合物, 可以稳定 RNA 的双链结构, 在一定程度上可以抵抗核酸酶的降解, 使其能够发挥应有的作用。

国家食品药品监督管理局在 2005 年印发的《预防用疫苗临床前研究技术指导原则》中明确提出

* 通讯作者 Tel: (010) 67095308; Fax: (010) 65115148; E-mail: hucq@niebpb.org.cn

“预防用疫苗在生产过程中不得添加青霉素或其他 β -内酰胺类抗生素;如在生产过程中添加除上述以外的其他抗生素,应建立相应的检测方法并规定抗生素残留量的要求”。按照相应的制造检定规程,人用皮卡狂犬病疫苗和皮卡佐剂中,每剂(1 mL)均含有1000单位的卡那霉素。因此,有必要建立准确、快速、通用性好的含量测定方法,用以控制人用皮卡狂犬病疫苗和皮卡佐剂中的卡那霉素含量。

1 仪器与材料

1.1 仪器 LC-20AT液相色谱仪;DGU-20A₃在线脱气机;SIL-20AC自动进样器;CTO-10AS VP柱温箱;SPD-M20A紫外可见二极管阵列检测器;LCsolution液相色谱工作站(日本岛津公司);CAPCELL PAK C₈ DD (4.6 mm × 250 mm 5 μ m)色谱柱;METTLER TOLEDO XS205分析天平;BECKMAN Φ 660酸度计;BECKMAN Avanti™30 Centrifuge离心机。

1.2 试药与试剂 人用皮卡狂犬病疫苗1批(批号:20070701)、皮卡佐剂3批(批号:060501-7, 080601-2, 090401-800-2-1),均由北京依生兴业科技有限公司提供;卡那霉素对照品(批号:130556-200501;含量:66.5%)由中国食品药品检定研究院提供。磷酸二氢钾、氢氧化钾、乙醇、2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS)、吡啶均为分析纯;甲醇、乙腈均为色谱纯;水为超纯水。

2 实验方法

2.1 色谱条件与系统适用性试验 色谱柱:CAPCELL PAK C₈ DD (4.6 mm × 250 mm 5 μ m);流动相:[磷酸二氢钾缓冲液(0.02 mol · L⁻¹, pH 7.5)(取磷酸二氢钾1.36 g,加水500 mL使溶解,用1 mol · L⁻¹氢氧化钾溶液调节pH至7.5,摇匀)]-甲醇-乙腈(23:7:40);流速:1.0 mL · min⁻¹;柱温:45 °C;采用柱前衍生化法,衍生化试剂:0.5%的2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS)溶液[精密量取TNBS(5%, W/V)1.0 mL,加水溶解并定量稀释成10 mL,摇匀];检测波长:350 nm^[2]。进样对照品溶液25 μ L,记录色谱图,卡那霉素峰与相邻杂质峰的分离度均应符合要求。

2.2 供试品溶液的制备

精密吸取人用皮卡狂犬病疫苗(皮卡佐剂)0.5 mL至离心管中,精密加入水7.5 mL,95%乙醇2.0 mL,涡旋震荡3 min,离心10 min(10000 r · min⁻¹),取上清液,作为溶液Ta。

精密吸取0.5%的TNBS溶液1.0 mL至试管中,按顺序精密加入溶液Ta 0.1 mL,吡啶1.5 mL,摇匀,作为溶液Tb。

将溶液Tb密封,置于70 °C水浴中加热20 min,取出后用自来水冷却至室温,精密加入乙腈1.0 mL,摇匀,即得供试品溶液。

2.3 对照品溶液的制备

取卡那霉素对照品适量,用19%乙醇溶液溶解并稀释成每1 mL中约含0.05 mg的溶液,摇匀,作为溶液Sa。

精密吸取0.5%的TNBS溶液1.0 mL至试管中,按顺序精密加入溶液Sa 0.1 mL,吡啶1.5 mL,摇匀,作为溶液Sb。

将溶液Sb密封,置于70 °C水浴中加热20 min,取出后用自来水冷却至室温,精密加入乙腈1.0 mL,摇匀,即得对照品溶液。

2.4 阴性对照溶液的制备 精密吸取0.5%的TNBS溶液1.0 mL至试管中,按顺序精密加入19%乙醇溶液0.1 mL,吡啶1.5 mL,摇匀。密封,置于70 °C水浴中加热20 min,取出后用自来水冷却至室温,精密加入乙腈1.0 mL,摇匀,即得阴性对照溶液。

2.5 测定方法 分别进样供试品溶液和对照品溶液各25 μ L,按外标法以峰面积计算供试品中硫酸卡那霉素的含量。

3 结果

3.1 典型色谱图 阴性对照溶液、对照品溶液和供试品溶液的典型色谱图见图1。

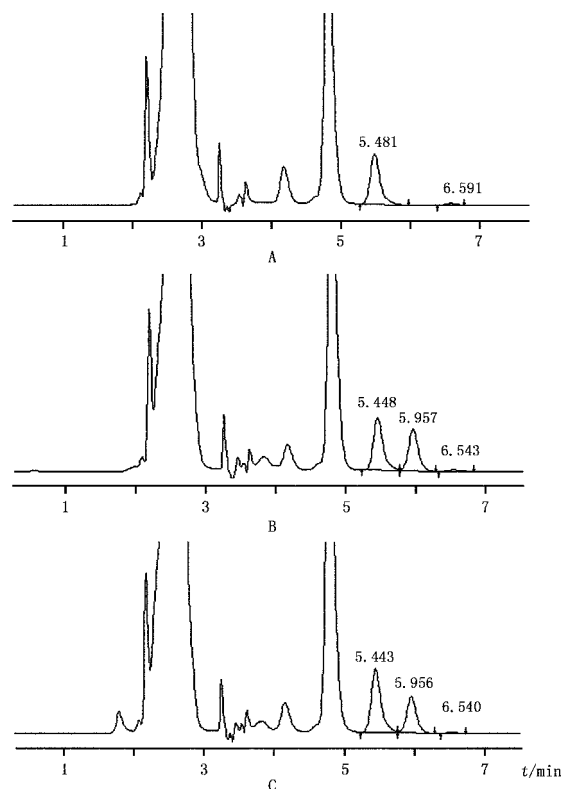


图1 卡那霉素测定的典型色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms for determination of kanamycin sulfate

A. 阴性对照(negative control) B. 对照品(reference substance)
C. 供试品(sample)

3.2 方法学考察

3.2.1 线性关系考察 取卡那霉素对照品适量,用

19% 乙醇溶液溶解并稀释成每 1 mL 中约含 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 mg 的溶液, 摇匀, 依“2.3”项下方法制备 7 个浓度的对照品溶液。每个浓度的对照品溶液分别进样 25 μ L, 记录色谱图, 以对照品溶液浓度 (C) 为横坐标, 以峰面积 (A) 为纵坐标绘制标准曲线, 其回归方程为:

$$A = 3 \times 10^6 C - 3313.9 \quad r = 1.000 (n = 7)$$

结果表明, 硫酸卡那霉素浓度在 0.01 ~ 1.0 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内, 与峰面积呈现良好的线性关系。

3.2.2 回收率试验 取卡那霉素对照品适量, 用 19% 乙醇溶液溶解并稀释成每 1 mL 中约含 0.1 mg 的溶液, 摇匀。取 3 支离心管, 按顺序分别精密加入卡那霉素含量已知的人用皮卡狂犬病疫苗各 0.5 mL, 上述对照品溶液 4.0, 5.0, 6.0 mL; 水 3.5, 2.5, 1.5 mL; 95% 乙醇各 2.0 mL, 分别涡旋震荡 3 min, 离心 10 min (10000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$), 取上清液, 依“2.3”项下方法制备 80%, 100%, 120% 3 个浓度的回收率试验用溶液, 每个浓度平行 3 份。按供试品的测定方法操作, 计算回收率, 结果见表 1。

表 1 回收率试验结果

Tab 1 Results of recovery experiment

浓度 (concentration) /%	加入量 (added) / μg	测得量 (found) / μg	回收率 (recovery) /%	平均回收率 (average recovery) /%	RSD /%
80	426.66	346.02	81.1	82.5	1.6
	415.90	347.69	83.6		
	450.82	373.73	82.9		
100	526.02	482.89	91.8	90.3	2.0
	529.41	481.23	90.9		
	533.33	470.93	88.3		
120	640.00	513.92	80.3	81.6	1.8
	648.56	527.28	81.3		
	654.22	544.31	83.2		

3.2.3 重复性试验 取同 1 份人用皮卡狂犬病疫苗平行测定 4 次, 计算 RSD。结果显示 4 次测定的含量分别为 848.96, 871.80, 872.35, 881.22 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; 平均含量为 868.58 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, RSD 为 1.6%。

3.2.4 精密度试验 取同 1 份对照品溶液连续进样 6 次, 记录峰面积。结果显示, 卡那霉素峰面积的 RSD 为 0.36%。

3.2.5 最低检测限和最低定量限 取对照品溶液, 逐倍稀释后进样, 记录色谱图。按信噪比 (S/N) 等于 3 计算最低检测限 (LOD); 按信噪比 (S/N) 等于 10 计算最低定量限 (LOQ)。LOD 为 0.41 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; LOQ 为 1.39 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

3.2.6 溶液稳定性 取同 1 份供试品溶液, 室温放置, 分别于 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 h 进样, 记录峰面积。结果显示, 卡那霉素峰面积的 RSD 为 1.1%。

3.3 供试品的测定 按“2.2”及“2.3”项下方法分别制备供试品溶液和对照品溶液, 按“2.5”项下方法操

作, 测定供试品中的硫酸卡那霉素含量, 结果见表 2。

表 2 样品的含量测定结果

Tab 3 Results of content determination of samples

样品名称 (sample name)	批号 (Lot No.)	含量 (content) / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$
人用皮卡狂犬病疫苗 (PIKA rabies vaccine for human use)	20070701	889.34
皮卡佐剂 (PIKA adjuvant)	060501-7	1137.69
皮卡佐剂 (PIKA adjuvant)	080601-2	698.29
皮卡佐剂 (PIKA adjuvant)	090401-800-2-1	860.38

4 讨论

4.1 供试品溶液的制备 加入 95% 乙醇, 是为了使疫苗或佐剂中的蛋白质成分发生变性, 聚集, 离心后沉淀, 不干扰后续的衍生化反应。衍生化反应为保证重现性良好, 需严格控制条件, 其中包括衍生化试剂 (TNBS)、离心上清液、反应介质 (吡啶) 的加入量、加入顺序、反应温度、反应时间等。加入乙腈是可使衍生化反应生成的有色物质在 10 h 内稳定, 以利于测定^[2]。

4.2 方法的回收率 在人用皮卡狂犬病疫苗和皮卡佐剂中, 卡那霉素是为稳定皮卡 RNA 的双链结构而添加的微量成分, 因此可以作为有关物质进行控制。国家食品药品监督管理局药品审评中心在 2006 年发布的《有关物质分析方法验证的可接受标准简介》中提出“回收率的可接受标准为低、中、高 3 个浓度下的平均回收率均应在 80% ~ 120% 之间, RSD 均不应大于 10%”。本文建立的方法, 在 80%, 100%, 120% 3 个浓度下的平均回收率分别为 82.5%, 90.3%, 81.6%; RSD 分别为 1.6%, 2.0%, 1.8%, 符合上述标准的要求。

4.3 方法建立的意义 卡那霉素等氨基糖苷类抗生素可以采用 HPLC-ELSD 法直接测定而免于操作较为烦琐的衍生化反应, 但目前 ELSD 检测器的普及程度尚不够高, 方法的应用面相对较窄, 本文建立的方法采用柱前衍生化联合间接紫外检测, 通用性较好。此外, 本文建立的方法除了可以检测疫苗等生物制品中的卡那霉素外, 在检测新霉素 (为疫苗中常用的又 1 种氨基糖苷类抗生素) 方面也有很大的前景, 相关的实验工作正在开展中。

参考文献

- 1 LIN Hai-xiang (林海祥), Perrin P. Experimental study on rabies vaccine plus PIKA adjuvant (皮卡狂犬病疫苗的实验研究). *Chin J Biol* (中国生物制品学杂志), 1998, 11(3): 137
- 2 Gambardella P, Punziano R, Gionti M, et al. Quantitative determination and separation of analogues of aminoglycoside antibiotics by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr*, 1985, 348: 229

(本文于 2011 年 3 月 24 日收到)