

气相色谱法测定百白破中甲醛

GC-137

摘要：本文使用 Nexis GC-2030 气相色谱仪建立了百白破疫苗中残留甲醛的含量测定方法。采用衍生后提取的前处理方法，对甲醛标样和待测百白破疫苗进行处理，Nexis GC-2030 检测，外标法定量。检测结果表明，本例中在 1~100 ppm 的浓度范围内建立的标准曲线线性关系良好（相关系数 0.9998）。在百白破疫苗中加标浓度为 2、10 和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的甲醛标液，测定的回收率在 83.16%~90.35% 范围内。以上数据分析表明，此方法结果可靠，前处理方法可操作性强，可以为百白破疫苗中甲醛含量的测定提供参考。

关键词：气相色谱仪 疫苗 百白破 甲醛

百白破（DTP）疫苗是百日咳、白喉类毒素和破伤风类毒素按照一定比例组成的三联疫苗，用于预防百日咳、白喉和破伤风三种疾病，它是全球接种率最高的疫苗。

甲醛是百白破疫苗中白喉类毒素和破伤风类毒素的脱毒剂。过多甲醛的残留会导致人体的不良反应：甲醛可以与蛋白质的氨基、巯基、羟基等多种基团发生反应，从而破坏蛋白质结构。百白破疫苗中甲醛的残留量，反应了不同厂家脱毒工艺的差异性和疫苗的质量。因此，需要对甲醛的残留量进行严格监控。

《中华人民共和国药典》第三部（2015 版），以下简称“中国药典”，以衍生 - 紫外分光光度法为检测方法，检测百白破等疫苗中甲醛的残留。受限于检测方法的灵敏度和选择性，以该方法为基础的疫苗中甲醛的限定浓度均较高，如百白破疫苗中甲醛的限定

浓度为 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。该方法较低的方法灵敏度使得各厂家百白破疫苗中均难有甲醛检出。为了提高检测灵敏度，武汉生物制品所发展了衍生 - 高效液相色谱法，用于百白破疫苗中甲醛和戊二醛的检测，该方法在一定程度上解决了甲醛检测灵敏度的问题，其线性范围为 20-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。但该方法采用衍生后直接进样的方式，导致铝佐剂、疫苗抗原蛋白等杂质吸附在色谱柱中，从而影响方法的长期稳定性。

气相色谱法通常采用弱极性溶剂作为样品处理溶剂，铝佐剂和疫苗抗原蛋白等杂质在该类溶剂中的溶解度小，可有效降低复杂基质对检测的干扰、提高方法稳定性。本文以气相色谱为基础，采用衍生、溶剂提取的前处理方式，建立了甲醛的含量测定方法，并用于多厂家、多批次国内外主要百白破疫苗产品中甲醛的检测。

■ 实验部分

1.1 仪器

岛津气相色谱仪 Nexis GC-2030

1.2 分析条件

色谱柱：Rxi-5, 30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm

柱温程序：

150 $^{\circ}\text{C}$ _12 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ _220 $^{\circ}\text{C}$ (3 min) _10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ _250 $^{\circ}\text{C}$ (3 min)

进样口温度：250 $^{\circ}\text{C}$

进样方式：分流

分流比：10:1

进样量：1 μL

载气：氮气

载气控制方式：恒线速度 (34 cm/s)

检测器：FID

检测器温度：250 $^{\circ}\text{C}$

空气流量：200 mL/min

氢气流量：32 mL/min

1.3 样品制备

前处理流程图：



图 1 前处理流程图

■ 结果与讨论

2.1 前处理条件优化

甲醛标准液用 2,4-二硝基苯肼（2,4-DNPH）衍生处理，本方法考察了不同衍生条件对衍生结果的影响。

2.1.1 衍生时间的优化

图 2 是保持其它条件不变，对衍生时间的优化结果。

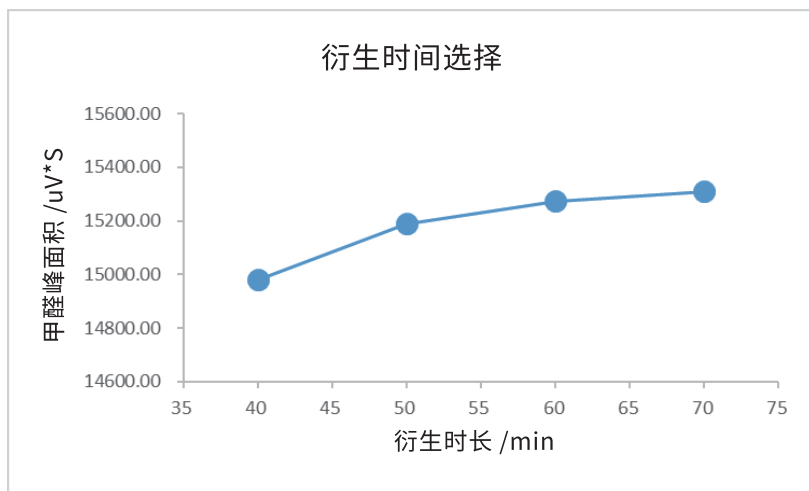


图 2 衍生时间的优化结果

实验表明，40°C ~70°C 的衍生温度下，上机检测得到的甲醛衍生物的峰面积在 60 min 后趋于稳定，故确定衍生时间为 60 min。

2.1.2 衍生温度的优化

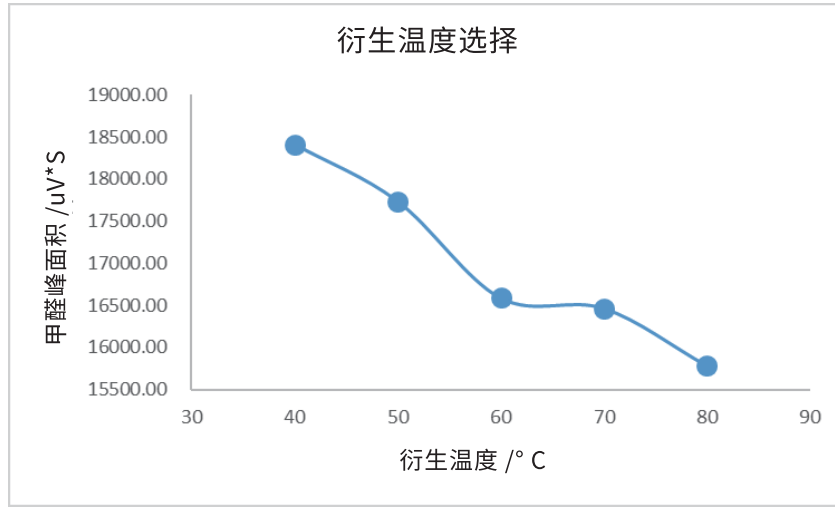


图3 衍生温度的优化结果

考察了 40°C ~80°C 范围内甲醛的衍生效果，衍生时间均为 60 min。结果表明，检测得到的甲醛衍生物的峰面积随衍生温度升高而降低，在 40°C 时衍生效率最高。40°C 以下温度在简易设备条件下不易稳定，因此选择衍生温度为 40°C。

2.1.2 提取溶剂的优化

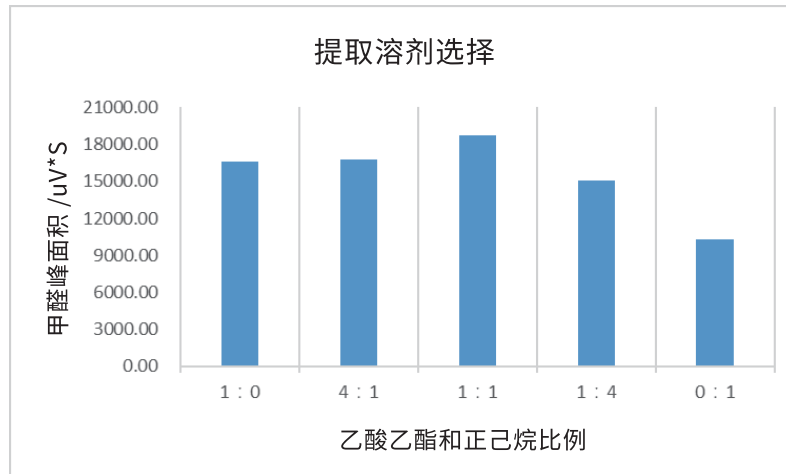


图4 衍生温度的优化结果

在溶剂考察方面，考虑到甲醛在水相（无机溶剂）中衍生，用极性相对弱的有机溶剂提取可以避免蛋白、铝佐剂等基质对目标峰检测的影响，延长色谱柱的使用寿命。因此考察了正己烷和乙酸乙酯对甲醛衍生物提取的效果，实验表明，当乙酸乙酯和正己烷比例为 1: 1 时，提取效率最高。推测，正己烷为非极性溶剂，对甲醛衍生物的溶解性高，但非极性的正己烷与水相接触面积小，因此提取不完全，造成提取效率低；乙酸乙酯有一定极性，可以和水相有更大的接触面积，因此促进了甲醛衍生物的提取。

2.2 标准品谱图

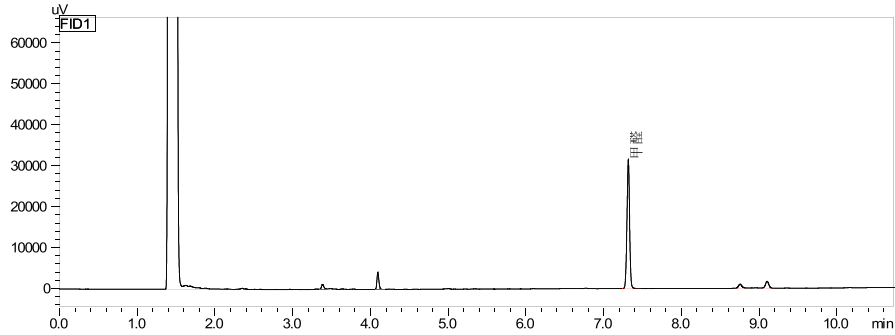


图5 甲醛标准品衍生产物色谱图

2.3 标准曲线

甲醛标准液经衍生处理，形成相应浓度的甲醛标准待测液，每个浓度取 1 μL 进样，以峰面积为纵坐标，以浓度为横坐标，绘制标准工作曲线，如图 6 所示，标准曲线相关系数系数达到 0.9998。

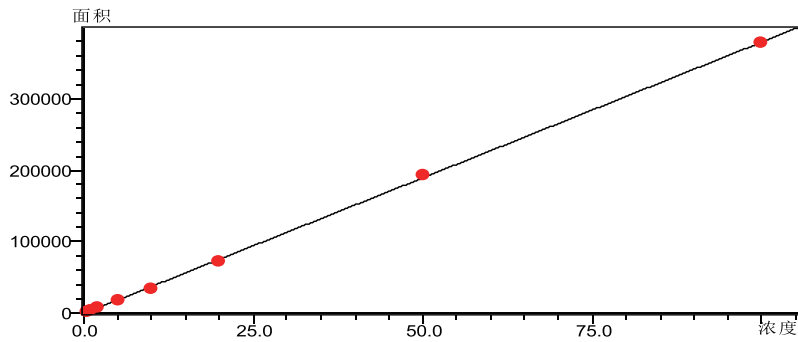


图6 甲醛标准曲线

2.4 精密度结果

取 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 甲醛标样进行衍生，取 1 μL 进气相色谱仪，连续进样 6 次，以峰面积 RSD 考察精密度，结果如表 1。

表 1 甲醛检测精密度结果 (RSD%, n=6)

组份	面积 1	面积 2	面积 3	面积 4	面积 5	面积 6	平均面积	RSD (%)
肌醇	4,130	4,242	4,230	4,263	4,323	4,332	4,253	1.73

2.5 检出限和定量限

以 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 甲醛标准测定液的数据，3 倍信噪比计算甲醛检出限，计算结果为 0.27 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ；10 倍信噪比计算甲醛定量限，计算结果为 0.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.6 回收率

取含量较低的疫苗样品，分别添加 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 三个浓度的标准溶液，按照样品前处理方法进行处理，计算回收率如表 2 所示：

表 2 百白破中甲醛回收率分析结果 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)

	浓度 1	浓度 2	浓度 3
加标浓度	2	10	50
测得含量 (扣本底)	1.803	8.316	45.175
回收率	90.15%	83.16%	90.35%

2.7 百白破疫苗中甲醛含量测定

本次共测试 6 个厂家共 18 批次百白破疫苗。按照实验前处理方法进行处理后，进气相色谱仪分析，检测结果如表 3 所示。

表 3 百白破疫苗产品甲醛含量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)

厂家编号	批次	甲醛含量 $\mu\text{g}/\text{mL}$
A	1	27.78
	2	28.01
	3	27.59
B	1	23.55
	2	25.86
	3	24.66
C	1	--
	2	6.81
	3	6.81
D	1	37.30
	2	39.82
	3	43.89
E	1	26.66
	2	27.16
	3	26.27
F	1	15.52
	2	15.58
	3	15.65

注：—表示有检出，但含量低于定量限

从同一厂家的三批次结果来看，其中五个厂家批次间差异不大，推测这三个厂家甲醛脱毒工艺稳定；其中一个厂家的一个批次甲醛残留量与另外两个批次间差异较大，推测此批次百白破疫苗的脱毒过程与其它两批次存在明显差异。

从整体结果对比不同厂家的结果，除 C 厂家批次 1 以外，六个厂家百白破疫苗的甲醛残留量范围为 6.81~43.89 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。C 厂家批次 1 与其它样品一样有甲醛检出，但含量较低，低于本方法定量限。本文发展方法的线性范围可满足这些样品中残留甲醛的测定。同时，也反映被检测的 6 个厂家疫苗产品均符合中国药典 2015 年版三部吸附无细胞百白破联合疫苗中规定的“不高于 0.2 g/L”。

■ 结论

本文用 Nexis GC-2030 气相色谱仪建立了百白破疫苗中甲醛的含量测定方法。检测结果表明，本例中标准曲线的线性相关度为 0.9998，六厂家百白破的甲醛含量均在 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下，该方法能对低于此值的甲醛含量有很好的区分度，有利于疫苗厂家监测生产流程，在百白破疫苗中添加甲醛标样进行测试，回收率在 83.16%~90.35%，标准样品精密度 RSD 值为 1.73%。数据结果表明，Nexis GC-2030 适用于百白破疫苗中的甲醛的检测。

岛津应用云

