

# 气相色谱法检测灭活狂犬病病毒浓缩液中 $\beta$ -丙内酯的含量

梁婧<sup>△</sup>, 李举<sup>△</sup>, 马继华, 祁春华, 金文芳, 张智

武汉生物制品研究所有限责任公司 湖北 武汉 430207

**摘要:** 目的 建立气相色谱法检测狂犬病病毒浓缩液中  $\beta$ -丙内酯( $\beta$ -propiolactone, BPL)含量,分析 BPL 在灭活和水解过程中含量的变化。方法 气相色谱条件:初始温度 80 °C,保持 1 min,以 20 °C/min 的速率升温至 200 °C,保持 5 min,检测器温度为 250 °C,进样口温度为 150 °C,载气为氮气,流速为 1 ml/min,进样量为 1  $\mu$ l。验证该方法的专属性、重复性和耐用性,绘制标准曲线并确定检测限和定量限。利用该方法检测 BPL 以 1:2 000、1:4 000、1:8 000 进行灭活和水解过程中含量的变化。结果 气相色谱法检测狂犬病病毒浓缩液中 BPL 含量具有良好的专属性、重复性和耐用性,线性范围在 572.86 ~ 8.95  $\mu$ g/ml,定量限为 1.145  $\mu$ g/ml,检测限为 0.229  $\mu$ g/ml。以不同比例的 BPL 对狂犬病病毒浓缩液进行灭活,72 h 后其含量均高于定量限,水解 1 h 后 BPL 含量均低于检测限。结论 建立了 BPL 含量气相色谱检测方法,该方法准确可靠,可用于狂犬病疫苗生产过程中 BPL 含量的检测,为病毒灭活工艺验证提供了数据支持。

**关键词:** 狂犬病疫苗;气相色谱; $\beta$ -丙内酯

中图分类号: R373.9 O657.7+1 文献标识码: A 文章编号: 1004-5503(2017)12-1317-04

DOI:10.13200/j.cnki.cjb.002032

## Determination of $\beta$ -propiolactone content in inactivated rabies virus concentrate by gas chromatography

LIANG Jing, LI Ju, MA Ji-hua, QI Chun-hua, JIN Wen-fang, ZHANG Zhi

Wuhan Institute of Biology Products Co., Ltd., Wuhan 430207, Hubei Province, China

Corresponding author: ZHANG Zhi, E-mail: zhangzhi1949@aliyun.com

**Abstract:** **Objective** To develop a gas chromatography for determination of  $\beta$ -propiolactone (BPL) content in rabies virus concentrate and analyze the content change of BPL during inactivation and hydrolysis. **Methods** The condition for gas chromatography was as follows: the initial temperature of 80 °C was maintained for 1 min, which raised to 200 °C and was maintained for 5 min. The temperatures of detector and inlet were 250 and 150 °C respectively. Nitrogen was used as a carrier gas at a flow rate of 1 ml/min, and the sample load was 1  $\mu$ l. The developed method was verified for specificity, reproducibility and durability, of which the standard curve was plotted, and the quantification limit and detection limit were determined. Using the gas chromatography method, the content change of BPL at concentrations of 1:2 000, 1:4 000 and 1:8 000 in the process of inactivation and hydrolysis were determined. **Results** The developed gas chromatography for BPL content determination showed high specificity, reproducibility and durability, of which the linear range was 572.86 to 8.95  $\mu$ g/ml, the quantification limit was 1.145  $\mu$ g/ml, and the detection limit was 0.229  $\mu$ g/ml. After the concentrated rabies virus suspension was inactivated with BPL at various concentrations for 72 h, the BPL contents were higher than the quantification limit. However, after hydrolysis at 37 °C for 1 h, the BPL contents were lower than the detection limit. **Conclusion** A gas chromatography for determination of BPL content was developed, which was accurate, reliable and might be used for determination of BPL content during production of rabies vaccines. It provides a data basis for verification of virus inactivation procedure.

**Key words:** Rabies vaccine; Gas chromatography;  $\beta$ -Propiolactone (BPL)

狂犬病是由狂犬病病毒引起的人兽共患疾病,人和所有温血动物对该病毒均易感。狂犬病病毒在

全世界范围内分布广泛,每年有 1 000 万人需要暴露后治疗,1.5 万 ~ 7 万人死于狂犬病<sup>[1]</sup>,每年因狂犬病带来的经济损失可达 60 亿美元<sup>[2]</sup>。目前国内使用的狂犬病疫苗主要是纯化地鼠肾细胞疫苗和纯化

通讯作者:张智 E-mail: zhangzhi1949@aliyun.com

<sup>△</sup> 共享第一作者

Vero 细胞疫苗<sup>[3]</sup>。根据《中国药典》三部(2015 版)要求,目前国内预防狂犬病的人用狂犬病纯化疫苗采用  $\beta$ -丙内酯( $\beta$ -propiolactone, BPL)进行灭活。

$\beta$ -丙内酯又称 3-羟基丙酸内酯,是一种杂环类化合物,分子式为  $C_3H_4O_2$ ,相对分子质量为 72.06,沸点 155 °C,在常温下为无色黏稠液体<sup>[4]</sup>。BPL 直接与病毒核酸分子中的鸟嘌呤或腺嘌呤等作用,引起单链断裂或双螺旋链交联,从而改变核酸的结构而破坏其功能,使病毒完全丧失感染力,同时不破坏病原体的免疫原性<sup>[5-6]</sup>。但 BPL 对人体有害,是一种致癌物质。部分报道显示,BPL 的残留对于注射后可能会导致接种人员产生变态反应<sup>[7]</sup>。使用其灭活病毒的疫苗需进行生产工艺验证,保证其被完全去除,因此需对工艺中水解后的 BPL 残留量的检测方法进行验证,并检测其残留量。目前国内外已有通过高效液相色谱和气相色谱对 BPL 残留量进行检测的方法<sup>[6-8]</sup>。本研究在狂犬病病毒浓缩液中加入不同比例的 BPL,利用气相色谱法检测在灭活和水解过程中 BPL 含量的变化,为病毒的灭活验证提供数据支持。

## 1 材料与方法

**1.1 狂犬病病毒浓缩液** 3 批狂犬病病毒浓缩液(批号为 201510U001、201510U002 和 201510U003)由本公司制备。

**1.2 主要试剂及仪器** BPL 购自德国 SERVA 公司(含量:1.146 g/ml,批号:150217);乙腈溶液(色谱级)购自国药集团化学试剂有限公司;Agilent DB-624 毛细管柱(30 m × 0.250 mm × 1.40  $\mu$ m)和气象色谱仪(型号:Agilent 7890A)均购自美国 Agilent 公司。

**1.3 气相色谱条件** 初始温度 80 °C,保持 1 min,以 20 °C/min 的速率升温至 200 °C,保持 5 min;检测器温度为 250 °C;进样口温度为 150 °C;载气为氮气,流速为 1 ml/min,进样量为 1  $\mu$ l。

### 1.4 方法的验证

**1.4.1 专属性** 用乙腈溶液配制 1:4 000 的 BPL 作为标准溶液进行检测,确定其停留时间和分离度,分离度应大于 1.5。

**1.4.2 重复性** 配制 1:4 000 的 BPL 标准溶液(浓度为 286.43  $\mu$ g/ml)连续进样 6 次,计算峰面积和保留时间的相对标准偏差(relative standard deviation, RSD),应不大于 2.0%。

**1.4.3 耐用性验证** 配制 1:4 000 的 BPL 标准溶液,分别在不同检测器温度(245、250、255 °C)、不同

进样口温度(140、150、170 °C)条件下进行测定,计算在不同的检测器温度和不同的进样口温度下峰面积的 RSD,应不大于 5.0%。

**1.5 标准曲线的绘制及定量限、检测限的确定** 配制 1:2 000 的 BPL 标准溶液(浓度为 572.71  $\mu$ g/ml),依次稀释为 1:4 000、1:8 000、1:32 000、1:128 000 的浓度梯度,各浓度样品分别进样,以峰面积为纵坐标,BPL 标准溶液浓度为横坐标进行双对数回归,得到标准曲线回归方程,计算相关系数,应不小于 99.9%。在标准曲线的基础上,将 1:32 000 的 BPL 标准溶液继续倍比稀释进行检测,分析其色谱图,将信噪比大于 10 的最低样品浓度确定为此方法的定量限,将信噪比大于 3 的最低样品浓度确定为此方法的检测限。

**1.6 灭活过程中 BPL 含量检测** 用 1:2 000、1:4 000、1:8 000 的 BPL 对狂犬病病毒浓缩液进行灭活,于 2~8 °C 灭活 72 h,分别于 0、12、24、36、48、60、72 h 取样进行检测,根据峰面积计算并绘制其浓度与时间对应的变化曲线。

**1.7 水解过程中 BPL 含量检测** 用 1:2 000、1:4 000、1:8 000 的 BPL 对 3 批超滤病毒液 2~8 °C 灭活 72 h,再进行 37 °C 水解,每隔 30 min 取样检测 BPL 残留的峰面积,计算水解完毕后 BPL 的含量。

## 2 结果

**2.1 方法的专属性** 试验结果显示,BPL 在乙腈溶液和狂犬病病毒浓缩液中的保留时间分别为 5.163 和 5.144 min,具有很好的一致性,且乙腈及狂犬病病毒浓缩液中均无干扰峰存在,见图 1。分离度分别为 16.26 和 13.31,均大于 1.5,表明本色谱条件的色谱分离能力可满足试验需要。

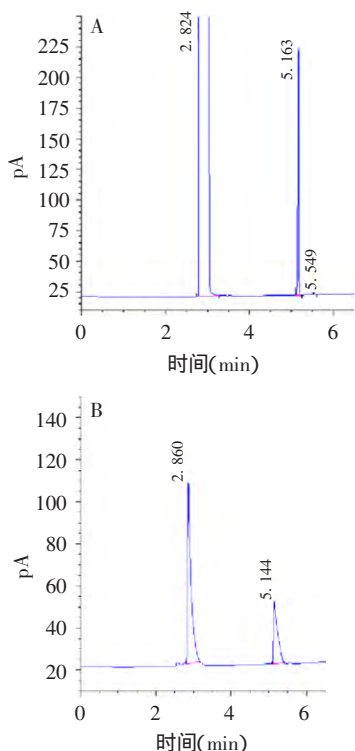
**2.2 方法的重复性** 试验结果显示,1:4 000 的 BPL 标准溶液进样 6 次,BPL 保留时间和峰面积的 RSD 分别为 0.05% 和 1.44%,见表 1。表明 BPL 含量的色谱检测法具有良好的重复性。

表 1 气相色谱法检测 BPL 含量的重复性分析

Tab 1. Reproducibility of gas chromatography for determination of BPL content

进样次数	保留时间(min)	峰面积
1	5.162	288.1
2	5.164	290.0
3	5.164	284.7
4	5.159	278.2
5	5.167	283.2
6	5.164	284.6
RSD(%)	0.05	1.44

**2.3 方法的耐用性** 试验结果显示, 1 : 4 000 的 BPL 标准溶液在不同检测器温度、不同进样口温度条件下测定, 色谱保留时间和峰面积的 *RSD* 分别为 0.3% 和 4.2%, 均能满足测定要求, 对测定结果无显著影响, 见表 2。



A: 乙腈 + BPL 气相色谱图, B: 样品 + BPL 的乙腈溶液。

图 1 气相色谱图

Fig 1. Gas chromatograms

**表 2 气相色谱法检测 BPL 含量的耐用性分析**

**Tab 2.** Durability of gas chromatography for determination of BPL content

进样口温度(°C)	检测器温度(°C)	保留时间(min)	峰面积
150	245	5.134	327.9
	250	5.133	327.7
	255	5.134	312.3
140	250	5.171	304.7
150		5.133	327.7
170		5.152	298.7
<i>RSD</i> (%)		0.3	4.2

**2.4 标准曲线及定量限、检测限** 试验结果显示, BPL 浓度在 572.86 ~ 8.95 μg/ml 范围内, 其峰面积与浓度呈线性关系, 线性方程为  $y = 1.119x - 5.57$ , 相关系数为 0.999, 见图 2。根据信噪比, 确定本方法的定量限为 1.145 μg/ml, 检测限为 0.229 μg/ml, 信噪比分别为 10.9 和 3.3。

**2.5 灭活过程中 BPL 含量** 试验结果显示, 狂犬病

病毒浓缩液在 2 ~ 8 °C 灭活过程中 BPL 浓度呈下降趋势, 尤其在 24 h 内, 1 : 2 000、1 : 4 000 和 1 : 8 000 BPL 含量分别下降 82.5%、85.5% 和 89.5%, 表明病毒的灭活主要集中在 24 h 内, 见图 3。

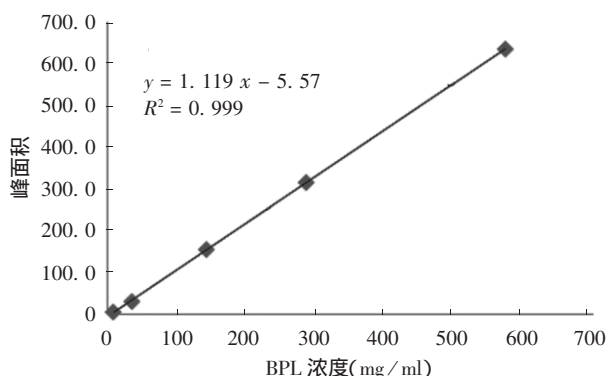


图 2 气相色谱法检测 BPL 含量的标准曲线

**Fig 2.** Standard curve for determination of BPL content by gas chromatography

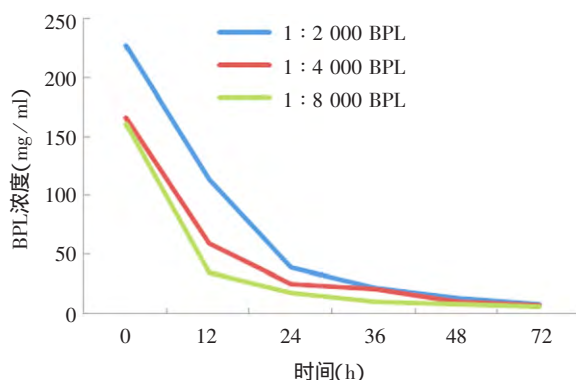


图 3 灭活过程中 BPL 含量曲线

**Fig 3.** Content curve of BPL during inactivation

**2.6 水解过程 BPL 含量变化** 试验结果显示, 3 批狂犬病病毒浓缩液用 1 : 2 000、1 : 4 000、1 : 8 000 的 BPL 灭活后水解 1 h, BPL 含量即低于检测限, 见图 4。

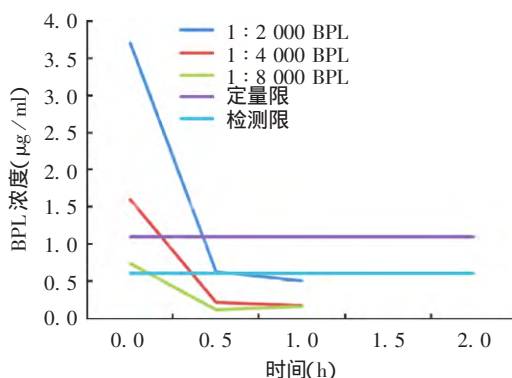


图 4 BPL 的水解曲线

**Fig 4.** Hydrolysis curve of BPL

### 3 讨论

BPL 是一种致癌物,易于水解,水解后形成人体正常代谢产物 β-羟基丙酸<sup>[9]</sup>,对人体无害。《中国药典》三部(2015 版)“冻干人用狂犬病疫苗(Vero 细胞)”中规定,对狂犬病病毒浓缩液的灭活按 1:4 000 比例加入 BPL,但药典未确定灭活和水解的时间以及 BPL 残留量的标准和检定方法。本研究以企业制定的工艺规程为指导,灭活 72 h,37 ℃水浴 2 h 进行水解,建立气相色谱法检测 BPL 含量,并对灭活和水解过程中 BPL 残留量进行检测。结果显示,在 37 ℃水浴 1 h 后,BPL 含量即低于检测限,满足生产安全需要。

本研究根据文献报道<sup>[10]</sup>采用乙腈作为对照稀释溶剂,有文献显示,加入 PBS 作为稀释剂时无法建立标准曲线,因此本研究采用乙腈作为稀释剂<sup>[11]</sup>。实验结果显示,BPL 在乙腈溶液和狂犬病病毒浓缩液中具有一致的保留时间,证明乙腈对 BPL 的气相色谱检测结果无影响。因此,本研究采用乙腈作为对照品溶液进行方法的验证,在室温条件下进行操作,大大降低了对试验条件和操作技术的要求。

由于气相色谱法可检测较低浓度的样品,结果准确可靠,已广泛应用于微量物质的定性和定量分析。本研究建立的气相色谱法操作简便,专属性强,在分离性能、线性范围、重复性和方法耐用性方面均可满足灭活狂犬病病毒浓缩液中残留 BPL 检测的需要,为病毒灭活工艺验证提供了有力的数据支持。

#### 参考文献

[1] CHTIOUI M, TRABELSI K, KALLEL H. Purification of rabies virus produced on Vero cells using chromatography techniques [J]. Cell Technol Cell Products, 2007, 3 : 629-634.

[2] ZHOU H P, LIU Y J, ZHANG X J, et al. Global epidemic situation and elimination strategies of rabies [J]. Chin J Amin Health Insp, 2015, 32 (1) : 50-52. (in Chinese)

周宏鹏,刘拥军,张秀娟,等. 全球狂犬病流行现状及防治策略 [J]. 中国动物检疫, 2015, 32 (1) : 50-52. (in Chinese)

[3] LIAO Y Y, ZHANG J K, YOU Z Y, et al. Current situation of Chinese purified vero cell rabies vaccine [J]. Chin J Vac Immun, 2015, 21 (5) : 580-588. (in Chinese)

廖玉宜,张吉凯,游志毅,等. 国产纯化 Vero 细胞狂犬病疫苗的发展现状 [J]. 中国疫苗和免疫, 2015, 21 (5) : 580-588.

[4] HOFFMAN R K, WARSHOWSKY B. β-propiolactone vapor as a disinfectant [J]. Appl Microbiol, 1958, 6 (5) : 358-362.

[5] LAWRENCE S A. β-propiolactone : viral inactivation in vaccines and plasma products [J]. PDA J Pharm Sci Technol, 2000, 54 (3) : 209-217.

[6] PERRIN P, MORGEAUX S. Inactivation of DNA by β-propiolactone [J]. Biologicals, 1995, 23 (3) : 207-211.

[7] 王真行,徐冰. WHO 关于狂犬病疫苗的意见书 [J]. 国外医学, 2002, 25 (6) : 245-248.

[8] YANG J, GAO J, ZHANG Q Y, et al. Development of gas chromatography for determination of β-propiolactone (BPL) content and analysis of BPL hydrolysis [J]. Chin J Biologicals, 2010, 23 (3) : 323-324, 332. (in Chinese)

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) : 323-324, 332.

[9] 高鸿瑞,董树林. 狂犬病疫苗 // 张延龄,张晖. 疫苗学 [M]. 北京:科学出版社,2004 : 1341.

[10] SHAN G Z, MA X, JI H, et al. Determination of residual β-propiolactone in inactivated rabies virus concentrate by gas chromatography [J]. China Pharmacy, 2014, 25 (25) : 2357-2359. (in Chinese)

山广志,马迅,纪宏,等. 气相色谱法检测灭活狂犬病病毒浓缩液中残留的 β-丙内酯 [J]. 中国药房, 2014, 25 (25) : 2357-2359.

[11] XU Y, WEI R, JIANG Y, et al. Study on the determination of β-propiolactone in rotavirus vaccine by gas chromatography [J]. Prog in Microbiol Immunol, 2010, 38 (3) : 21-23.

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) : 21-23.

收稿日期:2017-02-08 编辑:何巍

#### (上接第 1316 页)

[9] CHEN Z Y, WU Y H, ZHANG J F, et al. Development of ELISA method for recombinant hepatitis E virus antigen [J]. Chin J Biologicals, 2011, 24 (11) : 1363-1365, 1372. (in Chinese)

陈子杨,吴业红,张健锋,等. 重组戊型肝炎病毒抗原 ELISA 检测方法的建立 [J]. 中国生物制品学杂志, 2011, 24 (11) : 1363-1365, 1372.

[10] YU Y L. Expression, purification, assembly and identification of virus like particle antigens [J]. Prog in Microbiol Immunol,

2014, 42 (1) : 1-8. (in Chinese)

于永利. 病毒样颗粒抗原的表达、纯化、组装和鉴定 [J]. 微生物学免疫学进展, 2014, 42 (1) : 1-8.

[11] WANG J W, RODEN R B. Virus-like particles for the prevention of human papillomavirus-associated malignancies [J]. Expert Rev Vaccines, 2013, 12 (2) : 129-141.

收稿日期:2017-04-21 编辑:李靓