衍生气相色谱法测定鸡疫苗中游离甲醛的含量

张 璐,马秋冉,戴 青,董玲玲,赵富华,杨 星,于晓辉*

(中国兽医药品监察所,北京 100081)

[收稿日期] 2015 - 05 - 25 [文献标识码]A [文章编号]1002 - 1280 (2016) 07 - 0030 - 04 [中图分类号]S858.31

[摘 要] 建立了鸡疫苗中游离甲醛含量测定的衍生气相色谱法。用 2,4 - 二硝基苯肼衍生鸡疫苗中的游离甲醛后,环已烷萃取衍生物,HP - 5 毛细管色谱柱分离,气相色谱分析,电子捕获检测器检测,外标法定量。游离甲醛质量浓度在 0.05 ~ 5 mg/L 内与峰面积呈良好的线性关系,回归方程为 $Y = 2781.9X + 14.525$ ($r = 0.9999$)。平均加样回收率为 99.44% ($RSD = 1.87\%$)。本方法准确稳定,灵敏度高,重复性好,可用于鸡疫苗中游离甲醛的含量测定。

[关键词] 鸡疫苗;甲醛;2,4 - 二硝基苯肼衍生化;气相色谱法

Determination of Free Formaldehyde in Poultry Vaccine by Derivatization Capillary GC

ZHANG Lu, MA Qiu - ran, DAI Qing, DONG Ling - ling, ZHAO FU - hua, YANG Xing, YU Xiao - hui*

(*China Institute of Veterinary Drugs Control*, *Beijing* 100081, *China*)

Abstract: A GC method for the determination of free formaldehyde in poultry vaccine has been developed. The samples were derivatized by 2,4 - dinitrophenylhydrazine, extracted by cyclohexane, purifid with HP - 5 capillary column, seperated by GC with an electron capture detector and qualified by external standard calibration curves. The free formaldehyde in the vaccine showed a good linear relationship to peak area within a concentration range of 0.05 ~ 5 mg/L, the regression equation was: $Y = 2781.9X + 14.525$ ($r = 0.9999$). The average recovery using the established method was 99.44% ($RSD = 1.87\%$). The derivatization capillary gas chromatography method is developed, which is accurate, stable, sensitive, reproducible and might be used for determination of free formaldehyde in poultry vaccine.

Key words: poultry vaccine; formaldehyde; 2,4 - dinitrophenylhydrazine derivative; GC

甲醛是在鸡疫苗抗原灭活过程中用到的最传统、最广泛的化学灭活剂[1],是一种熔点 - 92 ℃、沸点 - 21 ℃的原生质毒素,疫苗中高甲醛残留将会影响鸡的健康。有研究表明,若抗原灭活后甲醛去除不彻底,将导致鸡疫苗中甲醛含量过高,引起鸡雌激素分泌下降,这可能是造成产蛋性能下降的

作者简介:张 璐,硕士,从事兽药检验及相关研究。

通讯作者:于晓辉。E - mail:yuxiaohui@ ivdc. org. cn

主要因素之一[2]。因此,需要对鸡疫苗甲醛残留量进行严格控制。

目前,对于甲醛的含量测定主要采用分光光度法、气相色谱法、液相色谱法等[3]。2010 年版《中华人民共和国兽药典》三部收录的鸡疫苗中甲醛残留量的测定方法为乙酰丙酮分光光度法[4],其存在的问题是很多鸡疫苗中含有有色物质,这些有色物质会对试验结果产生干扰,影响甲醛含量的准确测定。文献中尚未见采用气相色谱法测定鸡疫苗中甲醛含量的相关报道。本研究以鸡新城疫灭活疫苗为供试品,建立了测定鸡疫苗中游离甲醛含量的衍生气相色谱法,并应用该方法分别测定了四种鸡疫苗中甲醛的含量,这四种疫苗类型包括油苗、水苗及含有有色物质的疫苗等。

1 材料与方法

1.1 仪器和设备 Agilent 7890A 气相色谱仪及 7693 自动进样系统;HP-5 毛细管色谱柱(30 m×0.32 mm×0.25 μm);分析天平:感量 0.00001 g;KQ3200 型超声波清洗器;涡旋混合仪;DK-S22 型电热恒温水浴锅。

1.2 试剂和甲醛标准品 甲醛溶液(含量 37.0%~40.0%,经标定甲醛含量为 37%[4],国药集团化学试剂有限公司,批号:141120)。鸡新城疫灭活疫苗(批号:2015003)、猪细小病毒灭活疫苗 NJ 株(批号:20150002)、瑞仔健猪细小病毒病灭活疫苗(批号:1406003)、猪多杀性巴氏杆菌病灭活疫苗(批号:153503)。2,4-二硝基苯肼(2,4-DNPH)、盐酸、环己烷、吐温-80、乙醇均为分析纯。吐温-80 购自香港 GFCO 化学品供应,其余购自国药集团化学试剂有限公司。

1.3 色谱条件 采用 HP-5 毛细管柱,升温程序:初始温度为 150 ℃,保持 1 min,以每分钟 20 ℃的速率升温至 250 ℃,保持 6 min;进样口温度为 300 ℃,隔壁吹扫 3 mL/min,分流比为 50 ∶ 1;电子捕获检测器(ECD)检测器,检测器温度为 350 ℃,尾吹 60 mL/min。载气为 N_2,流量为 2 mL/min;进样量为 1 μL。

1.4 溶液的配制

1.4.1 衍生化试剂 取 2,4-DNPH 0.3 g 置 100 mL棕色容量瓶中,加入质量分数为 22% 的盐酸 60 mL,超声使溶解,摇匀,加水稀释至刻度,制成 2,4-DNPH 衍生化试剂。

1.4.2 对照品储备液 精密称取甲醛溶液适量置 100 mL 容量瓶中,用水稀释并定容至刻度,摇匀。从中取 10.0 mL 于 100 mL 容量瓶中,用水稀释并定容至刻度,摇匀,制成 0.1 mg/mL 的甲醛对照品储备液,临用前按需稀释配制。

1.4.3 供试品溶液 精密量取鸡新城疫灭活疫苗(油苗)5.0 mL,置 50 mL 容量瓶中,用 20% 吐温-80 乙醇溶液 10 mL,分次洗涤吸管,洗液并入 50 mL量瓶中,摇匀,加水稀释至刻度,强烈振摇,置分液漏斗中静置分层,吸取下层溶液 1.0 mL 于10 mL容量瓶中,加水稀释至刻度,制成供试品溶液[4]。

1.5 样品的衍生化处理方法 精密吸取对照品或供试品溶液各 1.0 mL,分别置 15 mL 离心管中,加入 2,4-DNPH 衍生化试剂 1 mL,涡旋 1 min,超声 5 min,60 ℃保温 45 min,迅速冷却,精密加入环己烷 3.0 mL,涡旋萃取 1 min,静置分层后取上层液置气相小瓶中,供气相色谱法测定。

2 方法学验证

2.1 样品的衍生化反应条件优化 纪宏等[3]在用衍生化气相色谱法测定重组乙型肝炎疫苗中游离甲醛含量时,对甲醛衍生化方法进行考察,试验表明超声时间、衍生化温度对衍生化结果影响不大,以环己烷作为萃取剂萃取率高于正己烷 14%。为保证衍生过程反应充分、衍生化产物萃取完全,取对照品溶液(1 mg/L),分别比较了衍生时间(30、45、60 min)、衍生化剂加入量(1、2、3 mL)、萃取剂加入量(2.0、3.0、4.0 mL)等因素对衍生化后测定灵敏度的影响,见图 1。为保证充分反应且节省时间,综合纪宏等[3]的研究结果,确定衍生时间为 45 min。比较衍生剂加入量和萃取剂加入量对含量测定结果的影响,最终确定加入 1 mL 的衍生剂,萃取剂为 3.0 mL 环己烷。

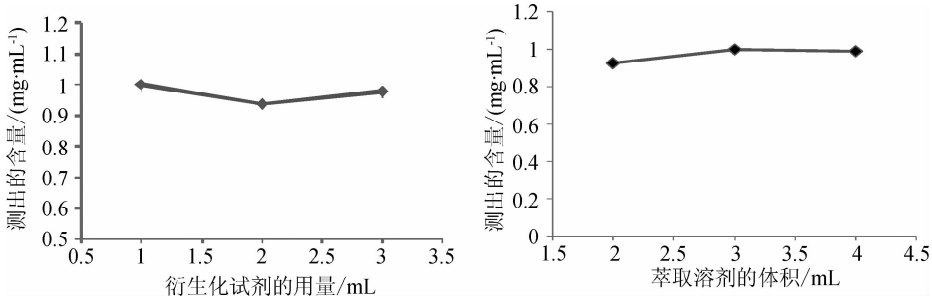
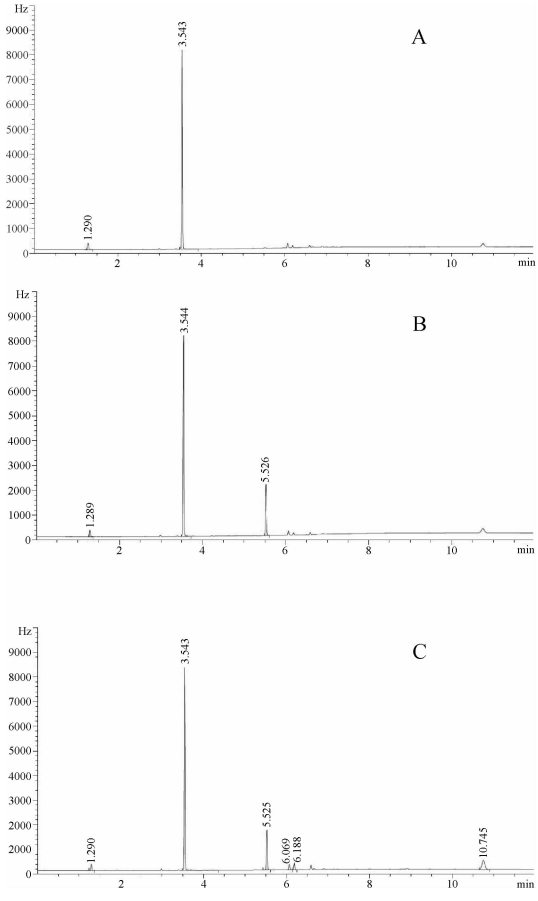


图 1　衍生化条件的考察结果

2.2　色谱系统的专属性　取鸡新城疫灭活疫苗供试品溶液,首先按 1.5 项下处理样品,然后按 1.3 项下色谱条件测定,游离甲醛衍生物与相邻最近色谱峰的分离度均大于 6.0,理论塔板数大于 200000,主峰保留时间约为 5.53 min。可见该系统能够满足甲醛衍生物和其他杂质成分达到基线分离的要求(图 2)。



A 空白;B 对照品;C 供试品

图 2　游离甲醛衍生化气相色谱图

2.3　标准曲线　取适量甲醛对照品储备液,加水稀释成浓度为 0.05、0.1、0.2、0.3、1、2、3、5 mg/L 的系列溶液。按 1.5 项下衍生化,供气相色谱分析。以各色谱峰的峰面积为纵坐标,对照溶液浓度为横坐标,进行线性回归,绘制标准曲线(图 3)得到回归方程 $Y = 2781.9X + 14.525$ ($r = 0.9999$)。表明游离甲醛含量在 0.05 ~ 5 mg/L 范围内,与峰面积呈良好的线性关系。

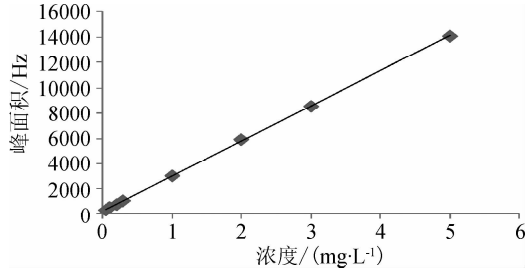


图 3　甲醛标准曲线图

2.4　精密度试验　取对照品溶液(1 mg/L),按1.5 项下衍生化后,照 1.3 项下色谱条件重复进样 6 次,记录色谱图,按峰面积计算 *RSD* 为 1.34%。表明仪器精密度良好。

2.5　重复性试验　精密取同一供试品溶液 6 份(批号:2015003)各 5.0 mL,分别置 50 mL 容量瓶中,按 1.4.3 项下稀释定容后。吸取 1.0 mL,置于 15 mL 离心管中,按 1.5 项下衍生化,照 1.3 项下色谱条件测定,计算游离甲醛平均含量为 0.0701 mg/mL,*RSD* 值为 1.82%,表明该方法重复性好。

2.6　定量限的确定　精密吸取质量浓度为 1 mg/L 的对照品溶液 1.0 mL,用水逐步稀释得到质量浓度为 0.5 、0.1、0.05 mg/L 的溶液,按 1.5 项下衍生化后,以 1.3 色谱条件测定。试验结果表明,在满足

信噪比大于10 ∶ 1时,0.05 mg/L甲醛溶液的基线波动与空白溶液的基线波动接近,故确定甲醛的最低定量限为0.05 mg/L。

2.7　甲醛衍生化产物的稳定性考察　精密吸取已知浓度的供试品溶液1.0 mL,按1.5项下衍生化后,将待测样品放入气相小瓶,密封瓶口,置4 ℃冰箱中,分别在0、2、4、6、8、12、24 h时测定峰面积(测定峰面积前要将供试品溶液放置至室温)。计算峰面积平均值为1941,*RSD*值为0.85%,表明甲醛衍生化产物24 h内测定较为稳定。

2.8　加样回收率试验　精密量取6份2.5 mL浓度为0.0701 mg/mL的供试品试液,分别置50 mL容量瓶中,加入0.1 mg/L的甲醛溶液1.8 mL,按1.5项下衍生化后,照1.3项下色谱条件测定。结果显示,加样回收率在96.72%~102.22%之间,*RSD*为1.87%,表明该方法回收率高(表1)。

表1　甲醛的加样回收率实验结果($n=6$)

供试品中甲醛的量/mg	添加甲醛的量/mg	测出甲醛的量/mg	回收率/%	平均回收率/%	*RSD*/%
0.1753	0.1800	0.3536	99.06	99.44	1.87
0.1753	0.1800	0.3565	100.67		
0.1753	0.1800	0.3538	99.17		
0.1753	0.1800	0.3494	96.72		
0.1753	0.1800	0.3593	102.22		
0.1753	0.1800	0.3532	98.83		

2.9　样品中游离甲醛含量的测定　取各样品溶液,按1.5项下衍生化后,照1.3项下色谱条件测定,计算鸡疫苗中游离甲醛含量(表2)。试验结果表明,4批鸡疫苗中游离甲醛含量的测定结果与本课题组新开发的利用紫外可见分光光度法、高效液相色谱法所测得的甲醛含量基本一致。

表2　鸡疫苗中游离甲醛含量测定结果

批号	含量/(mg·L^{-1})	平均含量/(mg·L^{-1})	*RSD*/%
20150003	0.0702	0.0711	1.14
	0.0718		
	0.0714		
20150002	0.2862	0.2857	0.35
	0.2863		
	0.2845		
1406003	0.1613	0.1594	1.53
	0.1566		
	0.1602		
153503	0.0565	0.0561	1.85
	0.0549		
	0.0569		

3　讨论与小结

为建立甲醛气相色谱条件,试验前期对色谱柱、进样口温度、色谱柱温度、检测器、检测器温度等因素进行了系统考察。使用不同极性的色谱柱,色谱柱型号包括DB-1、HP-5、DB-WAX,结合甲醛或甲醛衍生物的性质,在不同进样口温度(200~300 ℃)、色谱柱温度(150~250 ℃)、检测器温度(250~350 ℃)下,使用FID或ECD检测器,探究气相色谱对甲醛或甲醛衍生物的分离测定情况。试验结果表明,HP-5型色谱柱分别对甲醛或甲醛衍生物的分离效能最好。进样口温度、色谱柱温度及检测器温度只要在上述范围内,可确保检测器对甲醛或甲醛衍生物有响应。但对响应值起决定性因素的,是检测器的选择。试验结果表明,FID检测器对甲醛灵敏度极低,对甲醛衍生化产物几乎无响应。而ECD检测器对甲醛衍生化产物非常灵敏,有极低的检测限。故测定甲醛含量应使甲醛与2,4-DNPH衍生化后,使用ECD检测器进行检测。

综上所述,本文建立了测定鸡疫苗中游离甲醛含量的衍生气相色谱法。实验结果表明,本方法线性范围广,精密度好,准确度高,可以用于鸡疫苗中游离甲醛的含量测定。

参考文献:

[1]　徐守振,尹燕博,王　新. 动物疫苗中常用抗原灭活剂的研究进展[J]. 中国畜牧兽医,2010,37(9):162-167.

[2]　孟　迪,刘哲翔,曹金元,等. 禽流感灭活疫苗甲醛含量测定及对产蛋鸡雌二醇的影响[J]. 中国兽医杂志,2008,44(5):86-87.

[3]　纪　宏,马　迅,祁　进,等. 衍生化GC法测定重组乙型肝炎疫苗中游离甲醛的含量[J]. 沈阳药科大学学报,2015,32(4):289-293.

[4]　中华人民共和国兽药典[M]. 2010年版. 北京:中国农业出版社.

(编　辑:李文平)