

· 研究报告 ·

用气相色谱法测定血液制品生产过程中中间品乙醇的含量

盛凤仙, 李萍 (上海新兴医药股份有限公司, 上海 200135)

[摘要] **目的** 建立气相色谱法测定血液制品生产过程中中间品乙醇含量的方法。**方法** 采用 DB-624 毛细管色谱柱, FID 检测器, 气化室温度 230℃; 检测器温度 280℃; 柱温: 40℃, 保持 5 min 后, 以 10℃/min 升温至 80℃, 再以 50℃/min 升温至 230℃, 保持 3 min; 以正丙醇为内标。**结果** 乙醇在 0.5%~5% 浓度范围内线性关系良好 ($r=1.0000$), 平均回收率为 99.28%, RSD 为 0.01% ($n=9$)。**结论** 该方法简单灵敏, 结果准确可靠, 可用于血液制品生产过程中对中间品乙醇含量的测定。

[关键词] 中间品; 乙醇; 血液制品; 气相色谱法; 测定

[中图分类号] R284.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2019)05-0464-03

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.05.015

Determination of ethanol content in intermediate products during the production of blood products by GC

SHENG Fengxian, LI Ping (Shanghai Xinxing Medicine Co., Ltd, Shanghai 200135, China)

[Abstract] **Objective** To establish a method for determination of ethanol content in intermediate products during the production of blood products by GC. **Methods** DB-624 column was used with FID detection. The temperature of the injector and detector was 230℃, 280℃, respectively. The column temperature was kept at 40℃ for 5 minutes, then increased to 80℃ at 10℃ per minute, and finally to 230℃ at 50℃ per minute for 3 minutes. N-propanol was used as the internal standard. **Results** The standard curve was linear in the range of 0.05%-5% ($r=1.0000$) for ethanol. The average recovery was 99.28% with RSD of 0.01% ($n=9$). **Conclusion** This method was simple, sensitive, accurate and reliable. It is suitable for the determination of ethanol content in intermediate products during the production of blood products.

[Key words] intermediate products; ethanol; blood products; GC; determination

目前, 上海新兴医药股份有限公司采用国际先进的低温乙醇压滤法(Cohn法)^[1-2]制备人血白蛋白等血液制品, 该工艺生产过程中要求严格控制五大关键参数, 分别是温度、pH、离子强度、蛋白浓度和乙醇浓度, 对前4个参数都已建立了检测方法, 并且进行了测定, 而乙醇浓度采用称重法计算而得, 该法误差相对较大, 会影响到产品的纯度和得率。为了更好地控制产品质量, 确保生产出持续稳定的符合药品质量标准和注册要求的产品, 配合工艺验证的需求, 笔者参考有关文献^[3-5], 利用气相色谱法对血液制品生产过程中中间品乙醇的含量测定方法进行了探讨。

1 材料

1.1 仪器与试剂

安捷伦 6890N 气相色谱仪; 无水乙醇 (AR 级, 国药集团化学试剂有限公司, 含量 $\geq 99.7\%$); 正丙醇 (AR 级, 国药集团化学试剂有限公司, 含量 $\geq 99.0\%$); 钨酸钠 (AR); 硫酸 (AR); 10% 钨酸钠溶液 (取钨酸钠 10 g, 加注射用水定容至 100 ml); 0.33 mol/L 硫酸溶液 (取硫酸 1.86 ml 缓缓注入适量注射用水中, 放冷, 定容至 100 ml), 样品由研究部提供 (8% 乙醇蛋白溶液, 批号: ALB 20170119; 20% 乙醇蛋白溶液, 批号: ALB 20170119; 40% 乙醇蛋白溶液, 批号: ALB 20170119)。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备

精密吸取平衡至室温的 1.0 ml 样品溶液置于 10 ml 容量瓶中, 精密加入 0.2 ml 正丙醇内标溶液,

[作者简介] 盛凤仙, 本科, 执业药师, 研究方向: 生物制药, Email: wlrssfx@163.com

[通讯作者] 李萍, 本科, 执业药师, 研究方向: 生物制药, Email: limibao@163.com

再加入 1 ml 10% 钨酸钠溶液和 1 ml 0.33 mol/L 硫酸溶液,用注射用水定容至刻度,混匀,静置 30 min 后,用 0.45 μm 水溶性膜过滤,备用。

2.2 色谱条件

色谱柱:DB-624 毛细管色谱柱(0.25 mm × 30 m,1.4 μm);FID 检测器;气化室温度 230℃;检测器温度 280℃;柱温:40℃保持 5 min 后,以 10℃/min 升温至 80℃,再以 50℃/min 升温至 230℃,保持 3 min;柱流量:1 ml/min;空气:400 ml/min;氢气:40 ml/min;分流比 100:1;进样量 0.5 μl。

2.3 专属性试验

精密吸取不含乙醇的含蛋白 0.1% 的空白溶液 1.0 ml 置于 10 ml 容量瓶中,不加正丙醇内标,加入 1 ml 10% 钨酸钠溶液和 1 ml 0.33 mol/L 硫酸溶液,用注射用水定容至刻度,混匀,静置 30 min 后用 0.45 μm 水溶性膜过滤,取 0.5 μl 按“2.2”项下色谱条件测定,记录色谱图(图 1);另外,分别取按“2.5”项下方法制备的对照品溶液和按“2.1”项下方法制备的供试品溶液 0.5 μl,同样按“2.2”项下色谱条件测定,记录色谱图(图 2、图 3)。从图 1 可见,没有色谱峰出现,说明处方中其他成分对乙醇含量测定无干扰;从图 3 可见,乙醇峰与正丙醇峰完全分离,分离度大于 1.5,互不干扰,专属性好。

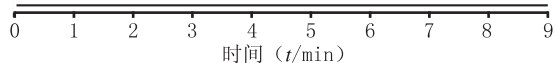


图 1 空白溶液色谱图

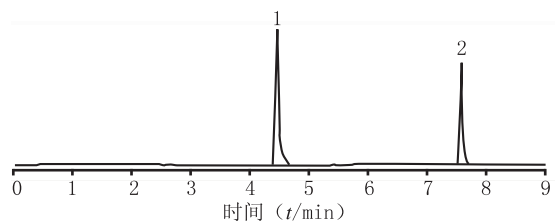


图 2 对照品溶液色谱图

1. 乙醇;2. 正丙醇内标

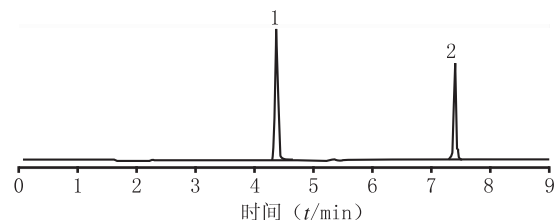


图 3 供试品溶液色谱图

1. 乙醇;2. 正丙醇内标

2.4 系统适用性试验

从图 2 可知,乙醇峰与正丙醇内标峰保留时间分别约为 4.4 min 和 7.5 min;乙醇峰与正丙醇内标峰分离度为 41.07,乙醇峰理论塔板数为 54 888,均符合《中国药典》要求。

2.5 线性关系考察

精密量取无水乙醇对照品 0.05、0.10、0.20、0.30、0.40、0.50 ml,分别置于已预先加入适量注射用水的 10 ml 容量瓶中,再向各对照品容量瓶中精密加入 0.20 ml 正丙醇内标溶液,用注射用水定容至刻度,混匀,按“2.2”项下色谱条件测定,记录峰面积。以各乙醇对照品峰面积与正丙醇峰面积之比(X),对乙醇对照品溶液浓度(Y,%)绘制曲线,得线性回归方程为 $Y=2.7285 \times 10^{-3} X + 2.5698$, $r=1.0000$ 。结果表明,乙醇对照品浓度在 0.5%~5% 范围内,乙醇对照品峰面积与正丙醇峰面积之比呈良好的线性关系。

2.6 回收率试验

精密量取 3.20、4.00、4.80 ml 无水乙醇对照品,分别置于已预先加入适量不含乙醇 0.1% 蛋白溶液的 10 ml 量瓶中,用不含乙醇 0.1% 蛋白溶液定容至刻度,混匀后即得 32.0% 乙醇蛋白溶液、40.0% 乙醇蛋白溶液、48.0% 乙醇蛋白溶液,按“2.1”项下方法制备供试品溶液,并按“2.2”项下色谱条件测定,记录峰面积,计算回收率,结果详见表 1。

表 1 乙醇回收率试验结果(%,n=9)

理论浓度	测得浓度	回收率	平均回收率	RSD
32.0	31.44	98.25	99.28	0.01
32.0	31.47	98.34		
32.0	31.42	98.19		
40.0	40.09	100.22		
40.0	40.13	100.32		
40.0	40.09	100.22		
48.0	47.66	99.29		
48.0	47.71	99.40		
48.0	47.64	99.25		

2.7 精密度试验

取按“2.5”项下方法制备的对照品溶液,并按“2.2”项下色谱条件操作,连续测定 5 次,记录峰面积,结果乙醇对照品峰面积与正丙醇内标峰面积之比(X)的 RSD 为 0.16%,表明精密度良好。

2.8 稳定性试验

取 8% 乙醇蛋白溶液(批号:ALB20170119),按

(下转第 469 页)

【参考文献】

[1] 黄希顺, 廖卫平, 李世焯, 等. 丙戊酸镁缓释片治疗癫痫临床应用专家共识[J]. 癫痫与神经电生理杂志, 2013, 22(1): 1-12.

[2] GLAUSER T, SHINNAR S, GLOSS D, et al. Evidence-based guideline: treatment of convulsive status epilepticus in children and adults; report of the Guideline Committee of the American Epilepsy Society[J]. Epilepsy Curr, 2016, 16(1): 48-61.

[3] KAYIHAN N, NENNESMO I, ERICZON BG, et al. Fatal deterioration of neurological disease after orthotopic liver transplantation for valproic acid-induced liver damage[J]. Pediatr Transplant, 2000, 4(3): 211-214.

[4] ANTONIUK SA, BRUCK I, HÖNNICKE LR, et al. Acute hepatic failure associated with valproic acid in children. Report of 3 cases[J]. Arq Neuropsiquiatr, 1996, 54(4): 652-654.

[5] DICKINSON RG, BASSETT ML, SEARLE J, et al. Valproate hepatotoxicity; a review and report of two instances in adults[J]. Clin Exp Neurol, 1985, 21, 79-91.

[6] SHAABAN AA, EL-AGAMY DS. Cytoprotective effects of diallyl trisulfide against valproate-induced hepatotoxicity: new anticonvulsant strategy [J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2017, 390(9): 919-928.

[7] AHMED N, ALJUHANI N, AL-HUJAILI HS, et al. Agmatine protects against sodium valproate-induced hepatic injury in mice via modulation of nuclear factor-KB/inducible nitric oxide synthetase pathway[J]. J Biochem Mol Toxicol, 2018, 32(12): e22227.

[8] 魏树礼. 生物药剂学与药物动力学[M]. 北京: 北京医科大学·中国协和医科大学联合出版社, 1997: 114.

【收稿日期】 2019-02-21 【修回日期】 2019-05-22

【本文编辑】 李睿旻

(上接第 465 页)

“2.1”项下方法制备供试品溶液, 分别在 0、4、8 和 12 h 按“2.2”项下色谱条件测定, 记录峰面积, 结果表明乙醇对照品峰面积与正丙醇内标峰面积之比分别为 0.317 1、0.317 3、0.317 6、0.317 3, RSD 为 0.06%, 表明处理后样品在 12 h 内稳定性良好。

2.9 重复性试验

取同一批(批号: ALB20170206) 40%乙醇蛋白溶液样品 6 份, 按“2.1”项下方法制备供试品溶液, 并按“2.2”项下色谱条件检测, 记录峰面积, 结果样品中乙醇含量分别为 39.00%、39.31%、39.38%、39.43%、39.36%、39.46%, 平均含量为 39.32%, RSD 为 0.42% (n=6), 表明方法重复性良好。

2.10 样品含量测定

分别取同一批样品(批号: ALB20170119) 而含不同浓度(8%、20%、40%)乙醇的蛋白溶液, 按“2.1”项下方法制备供试品溶液, 并按“2.2”项下色谱条件测定, 记录峰面积, 以线性回归方程计算得到供试品中乙醇含量, 结果均符合要求, 详见表 2。

表 2 样品中乙醇含量测定结果(n=2)

样品	乙醇与正丙醇内标峰面积之比	乙醇含量(%)
8%乙醇蛋白溶液	0.317 7	8.12
20%乙醇蛋白溶液	0.766 0	19.66
40%乙醇蛋白溶液	1.553 6	39.90

3 讨论

3.1 系统适用性试验

本实验条件下, 在空白溶液色谱图中未见色谱峰出现, 无其他杂质峰出现, 专属性好; 在本实验的

典型图谱中, 乙醇与内标正丙醇相邻两峰完全分开, 分离度大于 2, 乙醇峰理论塔板数大于 10 000, 符合药典要求。

3.2 实验注意事项

实验中应注意: 必须用校正过的移液器, 以确保加入内标正丙醇的量准确, 混合必须充分均匀, 沉淀蛋白必须完全, 这样才能确保实验顺利进行和结果的准确性。

3.3 本法优点

本法以正丙醇作为内标, 与其他方法(如比色法)^[6-8]相比, 具有操作简单、方法灵敏、测定结果准确可靠、重复性好等优点, 可用于血液制品生产过程中对中间品乙醇含量的测定。

【参考文献】

[1] 刘隽湘. 输血疗法与血液制剂[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 148-244.

[2] 倪道明. 血液制品[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 63-112.

[3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)2015年版[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 63-64.

[4] 谷日旭, 秦长睿, 马俊红, 等. 气相色谱内标法测定酒中乙醇的含量[J]. 山西预防医学, 1998, 7(1): 18-19.

[5] 杜利敏, 陈宁宁, 袁野. 毛细管柱气相色谱法测定白酒中乙醇的浓度[J]. 医药论坛杂志, 2015, 36(3): 64-65.

[6] 王兴红, 江东福, 马萍, 等. 低含量乙醇的简便测定方法[J]. 生物学杂志, 1995, 12(3): 28-29.

[7] 林仁权, 胡文兰, 陈国亮. 重铬酸钾氧化分光光度法测定酒中乙醇含量[J]. 浙江预防医学, 2006, 18(3): 78-79.

[8] 葛奉娟, 王欲晓, 周俊, 等. 重铬酸钾氧化比色法和气相色谱法定量分析发酵液中乙醇的比较研究[J]. 徐州工程学院学报(自然科学版), 2011, 26(2): 64-68.

【收稿日期】 2018-12-12 【修回日期】 2019-04-02

【本文编辑】 李睿旻