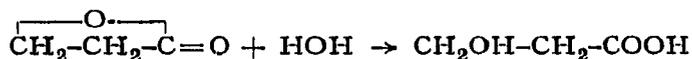


Notes

CHROM. 5918

Analyse de la β -propiolactone par chromatographie gaz-liquide**I. Recherche d'un résidu de β -propiolactone dans le vaccin antirabique Pasteur. II. Étude de la courbe d'hydrolyse de la β -propiolactone à pH 7.4**

La β -propiolactone (BPL) est utilisée au cours de la fabrication du vaccin antirabique Pasteur (inactivé et lyophilisé) à usage humain, à la concentration de 1/4000 dans le but d'inactiver le virus fixe. L'inactivation se poursuit pendant 3 h à température ordinaire (+22° à +24°) et ensuite pendant 48 h à +4°, dans un milieu tamponné à pH 7.4. Dans ce milieu, la BPL, produit cancérigène hautement toxique, s'hydrolyse en acide hydroxypropionique dépourvu de toute toxicité.



Le but de ce travail est de rechercher dans la suspension vaccinale la présence éventuelle d'un résidu de BPL, de l'isoler et de le doser et en outre d'étudier la courbe d'hydrolyse d'une solution témoin de BPL dans les conditions de l'inactivation. La sensibilité et la spécificité des méthodes de dosage de la BPL connues à ce jour sont insuffisantes pour cette étude.

TYLER ET BEESING¹ titrent la BPL par le thiosulfate de sodium en milieu tamponné, pour la doser dans des échantillons d'acide acrylique contenant 1% de lactone. La sensibilité de la méthode permet de rechercher au minimum 40 mg de lactone et de nombreuses impuretés sont susceptibles d'influencer la réaction.

FAYET *et al.*² dosent la BPL résiduelle dans le vaccin contre la fièvre aphteuse par colorimétrie avec la 4-nitro-benzylpyridine en milieu hydroalcoolique; ils retrouvent des quantités de lactone de l'ordre de 10 p.p.m.

Un examen par spectrophotométrie IR, effectué en nos laboratoires n'a pas donné de résultats satisfaisants. En principe cependant, la localisation relativement haute de la bande C=O de la BPL (1860 cm⁻¹ en solution dans le CCl₄) permettrait de doser directement celle-ci dans un extrait par le CCl₄ du vaccin lyophilisé: ni la présence d'acide hydroxypropionique produit d'hydrolyse de la BPL, ni celle de protéines, ne pourraient interférer, le groupement C=O de ces deux types de substances absorbant respectivement à 1725 cm⁻¹, et vers 1670 cm⁻¹. Toutefois, l'utilisation de cette technique d'analyse est limitée par la sensibilité de la méthode.

Dans les conditions opératoires suivantes: spectrographe Perkin-Elmer 21, à prismes, sans extinction d'ordonnée et, avec une cellule de 1 mm d'épaisseur, il n'est pas possible de détecter la BPL dans des solutions de teneur inférieure à 0.002%, soit 20 mg par ml (20 p.p.m.).

Un essai effectué sur un extrait par 1 ml de CCl₄ de 70 mg de vaccin lyophilisé

a été négatif, ce qui indique une teneur en BPL inférieure à 70 mg de BPL dans 5 ml de vaccin en suspension à 5 %.

Nous avons utilisé la chromatographie de partage gaz-liquide sur une phase polaire du type polyester (DEGS) additionnée d'acide phosphorique pour éviter l'absorption partielle de la lactone acide dans la phase stationnaire et les pertes en résultant sur le plan quantitatif.

Avec un détecteur à ionisation de flamme, nous pouvons identifier la BPL après séparation chromatographique et la doser par étalonnage interne dans un extrait chloroformique brut de la suspension vaccinale. En tenant compte de la récupération après traitement de la suspension vaccinale, on estime avec précision 4 p.p.m. de BPL; il est possible en utilisant le détecteur FID au maximum de sa sensibilité, de retrouver dans 5 ml de vaccin après extraction (quantité prévue pour une injection par voie sous-cutanée) environ 1 μ g de BPL (0.2 p.p.m.), sans toutefois garantir la proportionnalité de la réponse du détecteur.

Partie expérimentale et résultats

Reactifs. Chloroforme pour analyse (Merck), acide butyrique purissimum et propiolactone purissimum (Fluka), phénol, sulfate de sodium anhydre, chlorure de sodium pour analyse, phosphate monosodique $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, saccharose et soude en pastilles très pure.

Préparation des échantillons. Centrifuger à 2500 tours par minute, pendant 15 min, la suspension vaccinale reconstituée par l'addition de 5 ml d'eau pour injection par voie sous-cutanée, à un flacon de vaccin inactivé et lyophilisé. Extraire immédiatement le surnageant dans une ampoule à décanter, par agitation avec deux fois un volume de 10 ml et une fois un volume de 5 ml de chloroforme. Soutirer les extraits chloroformiques successifs; les filtrer sur filtre sec contenant environ 150 mg de sulfate de sodium anhydre. Rincer l'ampoule à décanter et le filtre avec 5 ml de chloroforme. Recevoir les extraits chloroformiques filtrés et le chloroforme de lavage dans un appareil de Kuderna-Danish modifié (voir Fig. 1). Concentrer la solution au bain-marie maintenu à $+90^\circ$, jusqu'à ± 5 ml. Détacher le tube gradué rodé,

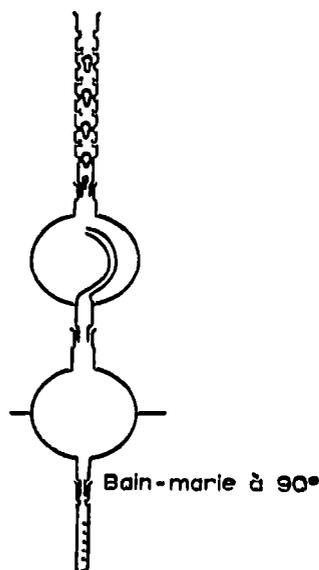


Fig. 1. Appareil de Kuderna-Danish modifié.

l'introduire dans un bain-marie à $+70^{\circ}$ et amener le volume à 1 ml en y soufflant de l'air pour favoriser l'évaporation. Ajouter 1 ml de la solution mère d'acide butyrique à 100 mg/100 ml. Injecter 1 μ l de ce mélange dans le chromatographe.

Chromatographie en phase gazeuse. La séparation chromatographique est poursuivie sur un appareil Aerograph 1700, avec un détecteur à ionisation de flamme, sur une colonne en acier inoxydable de 3 m \times 1/8 in., garnie de 15 % DEGS + 3 % H_3PO_4 sur Chromosorb W 100-120 mesh. Le débit du gaz vecteur (azote) est de 30 ml/min. La température du four est maintenue à $+120^{\circ}$, celle de la chambre d'injection et du détecteur étant réglée à $+150^{\circ}$.

La surface des pics est intégrée automatiquement par un intégrateur digital Infotronics CRS 104.

Identification. La BPL est identifiée par le rapport de son temps de rétention, au temps de rétention du pic du standard interne, l'acide butyrique. Dans les conditions opératoires indiquées plus haut, $t_R = 0.73$ (Fig. 2).

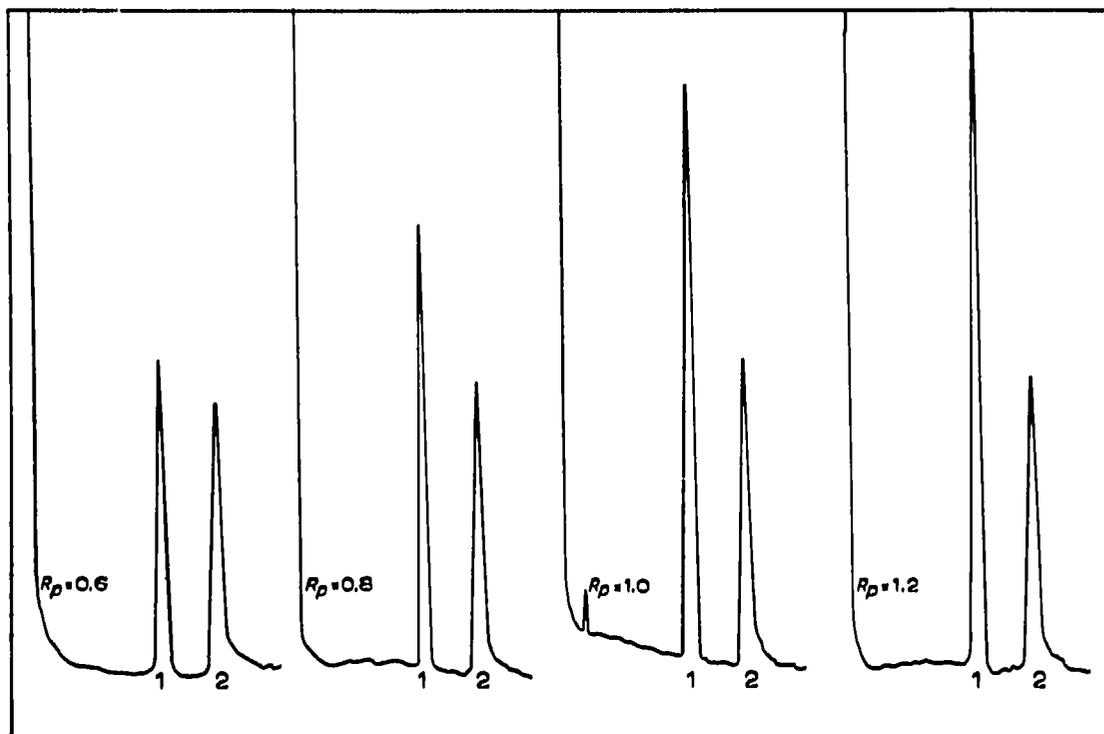


Fig. 2. Chromatogramme correspondant à plusieurs de la droite d'étalonnage. 1 = β -Propiolactone; 2 = acide butyrique. Att.: $10^{-11} \times 2$.

Détermination quantitative. Les mesures quantitatives nécessitent l'établissement d'une droite d'étalonnage avec l'acide butyrique comme standard interne. Dans des tubes bouchés émeri, numérotés de 1 à 10, on prépare, dans 1 ml de chloroforme, dix solutions contenant respectivement, 0.01, 0.04, 0.10, 0.14, 0.20, 0.40, 0.60, 0.80, 1.00, 1.20 et 1.40 mg de BPL, auxquelles on ajoute 1 ml d'une solution d'acide butyrique à 1 mg par ml. On dresse la courbe d'étalonnage, en portant les rapports du poids de la BPL au poids de l'acide butyrique (R_p) en abscisse, et les rapports des surfaces (R_s) correspondantes en ordonnée. On obtient une droite passant par l'origine,

qu'il est nécessaire de reproduire pour chaque essai; en effet la pente de la droite varie sensiblement d'une série d'injections à l'autre (voir Fig. 3).

Récupération. La nécessité de savoir si la récupération est constante pour des solutions de BPL de concentrations très différentes (cas se présentant lors de l'établissement de la courbe d'hydrolyse) nous a poussé à faire subir des essais de récupération aux solutions d'étalonnage. On dilue celles-ci à 25 ml, on leur fait subir les opérations de filtration, lavage, concentration, ajoute du standard interne décrites dans la méthode d'extraction. On obtient une droite de récupération moyenne à 50.1 %; la reproductibilité de la méthode est de 3.4 % (Fig. 4).

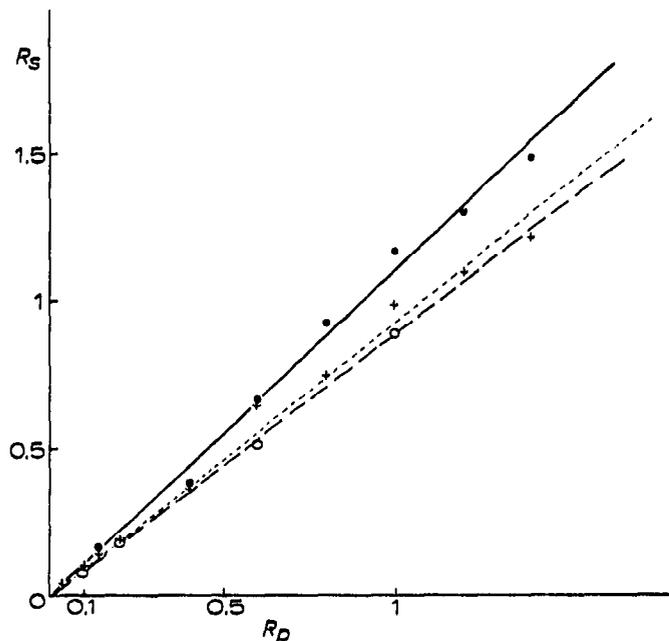


Fig. 3. Droites d'étalonnage: β -propiolactone/acide butyrique.

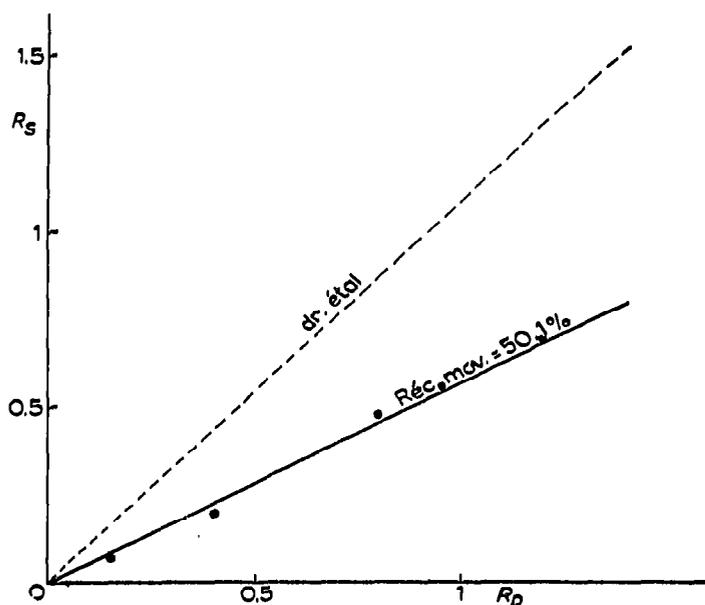


Fig. 4. Droite de récupération.

Nous avons appliqué cette technique à différents lots de vaccin antirabique Pasteur (lots de numéro inférieur à 0.28, ancienne fabrication, et supérieur à 0.28, nouvelle fabrication). On constate la présence de β -propiolactone dans tous les échantillons examinés, à une concentration voisine de $3 \mu\text{g}$ pour 5 ml de suspension vaccinale. Étant donné les réserves faites au sujet de la proportionnalité de la réponse dans les conditions d'utilisation limite de la sensibilité du détecteur FID, on peut dire que l'on retrouve moins de 2 p.p.m. de BPL dans les échantillons examinés (Fig. 5 et 6).

Hydrolyse témoin dans les conditions de l'inactivation. Peser 50 mg de β -propiolactone dans un ballon jaugé de 200 ml. Dissoudre à température ordinaire ($+22^\circ$

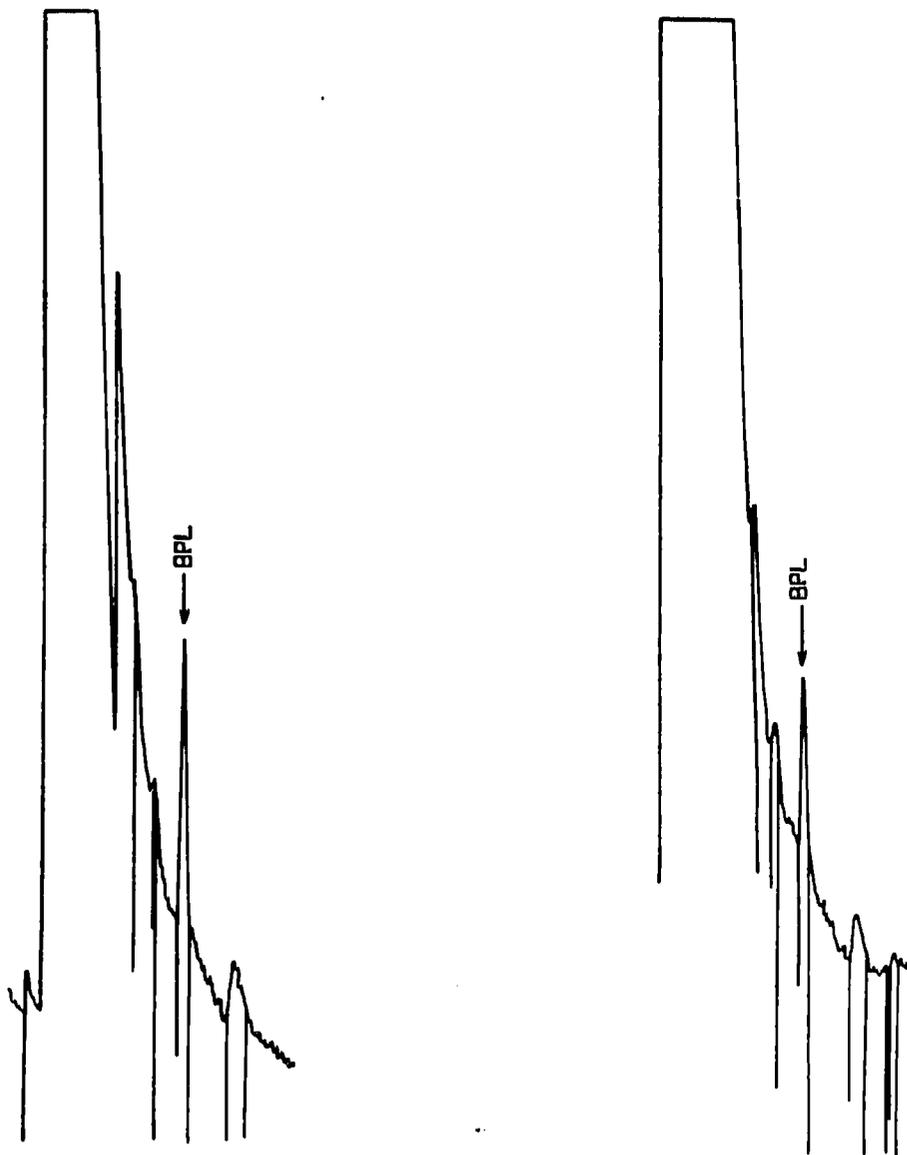


Fig. 5. Chromatogramme correspondant à un vaccin de numéro de lot inférieur à 028 (lot 004) (ancienne fabrication). Att.: $10^{-12} \times 2$.

Fig. 6. Chromatogramme correspondant à un vaccin de numéro de lot supérieur à 028 (lot 038) (nouvelle fabrication). Att.: $10^{-12} \times 2$.

à $+24^{\circ}$) dans le milieu tampon (chlorure de sodium 5.85 g, phosphate monosodique $\cdot 2H_2O$ 6.24 g, soude en pastilles 1.62 g, eau 1000 ml; à 1000 ml de ce soluté, ajouter 7.5 g de saccharose). Déclencher le chronomètre lorsque la première goutte de solution tampon entre en contact avec la BPL (t_0). Pipeter 5 ml de solution (contenant au temps t_0 1.25 mg de BPL) dans une ampoule à décanter, extraire immédiatement par le chloroforme pour analyse et traiter l'extrait de la façon indiquée pour la préparation des échantillons. Noter le temps lorsque l'on commence à agiter l'ampoule.

Recommencer les opérations décrites plus haut pour une série de fractions de 5 ml extraites aux temps t_{15} , t_{30} , t_{60} , t_{90} , t_{120} , t_{150} et t_{180} .

Au temps t_{180} , prélever une seconde fraction de 5 ml, dans laquelle on dissout 12.5 mg de phénol p.a. et laisser se poursuivre l'hydrolyse pendant 48 h au frigo à $+4^{\circ}$, avant d'extraire et de traiter la BPL restant en solution.

En tenant compte de la récupération moyenne (50.1 %), on a au temps t_n , en solution dans 5 ml de tampon, n_1 mg BPL = $R_p n \times 1 \text{ mg} \times (100/50.1)$ (Tableau I).

TABLEAU I

HYDROLYSE DE LA BPL DANS LES CONDITIONS D'INACTIVATION DU VACCIN ANTIRABIQUE PASTEUR

	Temps (t_n)				
	0 min 00 sec	3 min 00 sec	30 min 35 sec	60 min 42 sec	90 min 00 sec
n_1 mg BPL en solution dans 5 ml de tampon	1.250	0.950	0.440	0.360	0.270
	Temps (t_n)				
	120 min 19 sec	150 min 33 sec	180 min 45 sec	180 min 45 sec + 48 h à $+4^{\circ}$	
n_1 mg BPL en solution dans 5 ml de tampon	0.230	0.240	0.116	0.090	

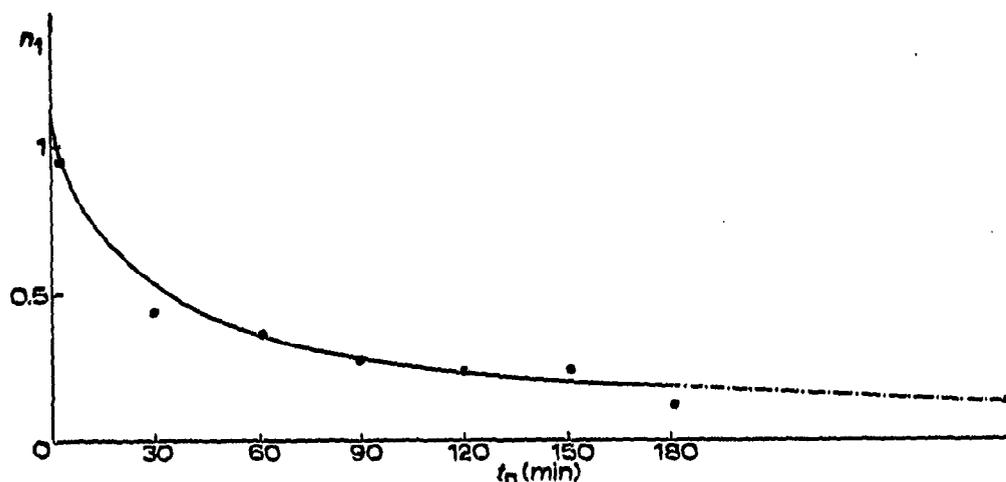


Fig. 7. Courbe d'hydrolyse de la β -propiolactone à pH 7.4; 3 h à température ordinaire suivies de 48 h à $+4^{\circ}$.

On s'aperçoit qu'après 30 min, les 2/3 de la BPL sont hydrolysés. À la fin de l'hydrolyse menée dans les conditions de l'inactivation, il reste 7.2 % de la quantité de BPL témoin mise en réaction (Fig. 7).

L'auteur tient à remercier M. J. A. W. GOSSELÉ pour ses excellents conseils et suggestions, Mme. C. CHARON pour les essais effectués par spectrophotométrie IR et M. E. BAERT pour son aide technique.

*Institut d'Hygiène et d'Épidémiologie,
Bruxelles (Belgique)*

M. O. SCHMITZ-MASSE

1 W. P. TYLER ET D. W. BEESING, *Anal. Chem.*, 24 (1952) 1511.

2 M. T. FAYET, H. G. PETERMAN, J. FONTAINE, J. TERRE ET M. ROUMIANTZEFF, *Ann. Inst. Pasteur, Paris*, 112 (1967) 65.

Reçu le 7 janvier 1972

J. Chromatogr., 70 (1972) 128-134