



# 中华人民共和国国家标准

GB/T XXXXX—XXXX

## 细胞培养过程中苯乙烯单体、2-氯乙醇残留 量测定 GC-MS 法

Determination of styrene monomer and 2-chloroethanol residues during cell culture  
by GC-MS

(点击此处添加与国际标准一致性程度的标识)

(征求意见稿)

(本稿完成日期：2021年11月02日)

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

国家市场监督管理总局  
国家标准化管理委员会 发布

## 前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由全国生化检测标准化技术委员会（SAC/TC 387）提出并归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

# 细胞培养过程中苯乙烯单体、2-氯乙醇残留量测定 GC-MS 法

警示——使用本文件的人员应有正规实验室工作的实践经验。本文件并未指出所有可能的安全问题，使用者有责任采取适当的安全和健康措施，并保证符合国家有关法规规定的条件。

## 1 范围

本文件规定了细胞培养过程中测定苯乙烯单体、2-氯乙醇残留量的气相色谱-质谱方法。

本文件适用于各类细胞制剂培养及制备过程中所使用和接触材料如离心管、移液器、培养皿、培养瓶、孔板等中苯乙烯单体、2-氯乙醇（ECH）迁移至培养液中的检测。

本文件的方法于苯乙烯单体检出限约为0.5 µg/L，2-氯乙醇检出限为250 µg/L。

## 2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GBT 14233.1-2008 医用输液、输血、注射器具检验方法 第1部分：化学分析方法

GBT 16886.7-2015 医疗器械生物学评价 第7部分：环氧乙烷灭菌残留量

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

**细胞培养液接触材料 Contact materials during cell preparation**

在正常使用条件下，各种已经或预期与细胞培养液接触的材料，包括但不限于可能在细胞分离、培养、制备过程中与细胞发生接触的塑料器材等。

## 4 原理

试样用甲醇溶剂提取后，用气相色谱-质谱法测定和确证苯乙烯单体和2-氯乙醇，内标工作曲线法定量。

## 5 试剂或材料

除非另有说明，本标准所用试剂均为色谱纯。水为符合GB/T 6682规定的一级水。

### 5.1 甲醇(色谱纯)

5.2 单一标准品：苯乙烯、苯乙烯 D8、2-氯乙醇，均为色谱级，纯度≥99.8%。

5.3 单一标准储备液：配制好后于 0 °C~4 °C 下密封保存，有效期为 3 个月。

5.3.1 苯乙烯(1 mg/mL)：准确称量 50 mg 标准品，于 50 mL 容量瓶中，用甲醇溶解并定容，得浓度为

1 mg/mL 的对照储备液。取 0.5 mL 于 50mL 容量瓶中，用甲醇稀释至刻度，配制成 10  $\mu\text{g/mL}$  溶液。

5.3.2 苯乙烯 D8(1 mg/mL): 准确称量 50 mg 标准品，于 50 mL 容量瓶中，用甲醇溶解并定容，得浓度为 1 mg/mL 的对照储备液。取 0.5 mL 于 50mL 容量瓶中，用甲醇稀释至刻度，配制成 10 $\mu\text{g/mL}$  溶液。

5.3.3 2-氯乙醇(1 mg/mL): 准确称量 50 mg 标准品，于 50 mL 容量瓶中，用甲醇溶解并定容，得浓度为 1 mg/mL 的对照储备液。

5.4 混合标准储备液: 分别准确吸取 1 mL 苯乙烯(10  $\mu\text{g/mL}$ )，5 mL 2-氯乙醇(1 mg/mL)于同一 10 mL 容量瓶中，加甲醇(4 $^{\circ}\text{C}$ )定容至 10 mL，混匀，可多次定容后配制成浓度均为苯乙烯 1  $\mu\text{g/mL}$ ，2-氯乙醇 500  $\mu\text{g/mL}$  的混合标准储备液。配制好后于 0  $^{\circ}\text{C}$ ~4  $^{\circ}\text{C}$  下密封保存，有效期为 3 个月。

5.5 内标工作溶液: 准确吸取 1 mL 苯乙烯 D8(10  $\mu\text{g/mL}$ )，加甲醇(4 $^{\circ}\text{C}$ )定容至 10 mL，混匀，配制成浓度均为 0.5  $\mu\text{g/mL}$  的内标工作液。

5.6 标准工作溶液: 取适量混合标准储备液(5.4)，用甲醇分别稀释一次稀释 1、5、10、50、100、500 倍，得浓度分别为 500(1.0)、100(0.2)、50(0.1)、10(0.02)、5(0.01)、1(0.002)  $\mu\text{g/mL}$  的标准溶液【2-氯乙醇(苯乙烯)】，各配制 10 mL，现配现用。

## 6 仪器设备

6.1 气相色谱—质谱联用仪: 配电子轰击源(EI源)。

6.2 超声波清洗器。

6.3 电子天平: 精度为 0.0001 g 和 0.01 mg。

6.4 涡旋混合器。

## 7 分析步骤

### 7.1 样品制备

精密量取 5 mL 细胞培养液(37  $^{\circ}\text{C}$  培养 24 小时)，置于 20 mL 顶空瓶中，再精密加入 100  $\mu\text{L}$  内标工作溶液(内标浓度相当于 0.01  $\mu\text{g/mL}$ )，同时加入 2 g 氯化钠粉末，密封并标识，现制现用。

### 7.2 标曲制作

精密量取 4.5 mL 水(37  $^{\circ}\text{C}$  培养 24 小时)，置于 20 mL 顶空瓶中，再精密加入 0.5 mL 各稀释度混标以及 100  $\mu\text{L}$  内标工作溶液，同时加入 2 g 氯化钠粉末，密封并标识，现制现用。

### 7.3 样品处理

供试品瓶置于自动顶空进样器孵化器中 90  $^{\circ}\text{C}$  加热孵化 20 min。取 2 mL 气体顶空进样，注入 GC-MS 系统中。

### 7.4 仪器参考条件

#### 7.4.1 气相色谱参考条件

- 色谱柱: DB-624 色谱柱(60m  $\times$  250 $\mu\text{m}$   $\times$  0.25 $\mu\text{m}$ );
- 柱温: 45  $^{\circ}\text{C}$ ，保持 4min; 5  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  升温至 140  $^{\circ}\text{C}$ ;
- 进样口温度: 200  $^{\circ}\text{C}$ ;
- 检测器温度: 250  $^{\circ}\text{C}$ ;
- 载气流速(He): 1.5 mL/min;

f) 分流比：5：1。

#### 7.4.2 质谱参考条件

- a) 离子源：电子轰击源（EI源）；
- b) 检测方式：特征离子监测（SIM）；
- c) 电离能量：70eV。

### 7.5 气相色谱-质谱测定

#### 7.5.1 定性测定

在相同的实验条件下，被测物的色谱峰保留时间和标准工作溶液的一致（变化范围在±2.5%以内），所选择的离子对均出现，而且所选择的离子对丰度比和对照品离子对的相对丰度比偏差不超过表1规定的范围，则可判断样品中存在对应的被测物。

表1 定性离子对相对丰度的最大允许偏差

相对离子丰度/%	>50	>20~50	>10~20	≤10
允许的相对偏差/%	±20	±25	±30	±50

#### 7.5.2 定量测定

在仪器最佳工作条件下，将标准工作溶液或混合标准工作溶液依次进样分析，以被测物和内标物的定量离子对峰面积比为纵坐标，以被测物的浓度为横坐标绘制标准工作曲线，用标准工作曲线对样品进行定量，应使样品溶液中各被测物的响应值在仪器测定的线性范围内，如果含量超过标准工作曲线范围，应稀释到合适浓度后再进样分析。

### 7.6 平行试验

按步骤7.3对同一试样进行平行测定。

## 8 结果分析

残留量用浓度表示。按式（1）计算被测物中残留物的浓度：

$$X = \frac{V \times C \times V_1}{V_2} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

X——被测物中残留物浓度，单位为纳克每毫升(ng/mL)；

V——量取的培养液体积(5 mL)；

C——标准曲线上找出的供试液相应的浓度，单位为纳克每毫升(ng/mL)；

V<sub>1</sub>——标准工作溶液的体积，单位为毫升(mL)；

V<sub>2</sub>——被测物溶液的体积，单位为毫升(mL)；

计算结果以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示，结果保留两位小数。

## 9 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的15%。

附录 A  
(规范性)

细胞培养液中常见残留物和内标的定量限

A.1 常见残留物和内标的定量限见表 A.1。

表 A.1 残留物及内标的定量限

序号	中文名称	英文名称	CAS号	分子式	分子量	定量限 (μg/L)
1	苯乙烯	Styrene	100-42-5	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub>	104.15	0.5μg/L
2	2-氯乙醇	Ethylene chlorohydrin	107-07-3	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ClO	80.52	250μg/L
内标	苯乙烯 D8	1,2,3,4,5-pentadeuterio-6-(1,2,2-trideuterioethenyl)benzene	19361-62-7	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub>	104.15	--

## 附录 B

(资料性)

## 残留物及内标的 MRM 质谱分析参数

B.1 残留物及内标的 MRM 质谱分析参数见表 B.1。

表 B.1 残留物及内标的 MRM 质谱分析参数

序号	中文名称	保留时间/min	定量离子对	定性离子对	驻留时间/ms
1	苯乙烯	8.06	49.0	80.0	100
2	2-氯乙醇	11.30	104.1	78.1	100
内标	苯乙烯D8	11.25	112.1	84.1	100

附录 C  
(资料性)  
残留物及内标的反应监测 (MRM) 色谱图

C.1 残留物及内标的反应监测 (MRM) 色谱图见图 C.1。

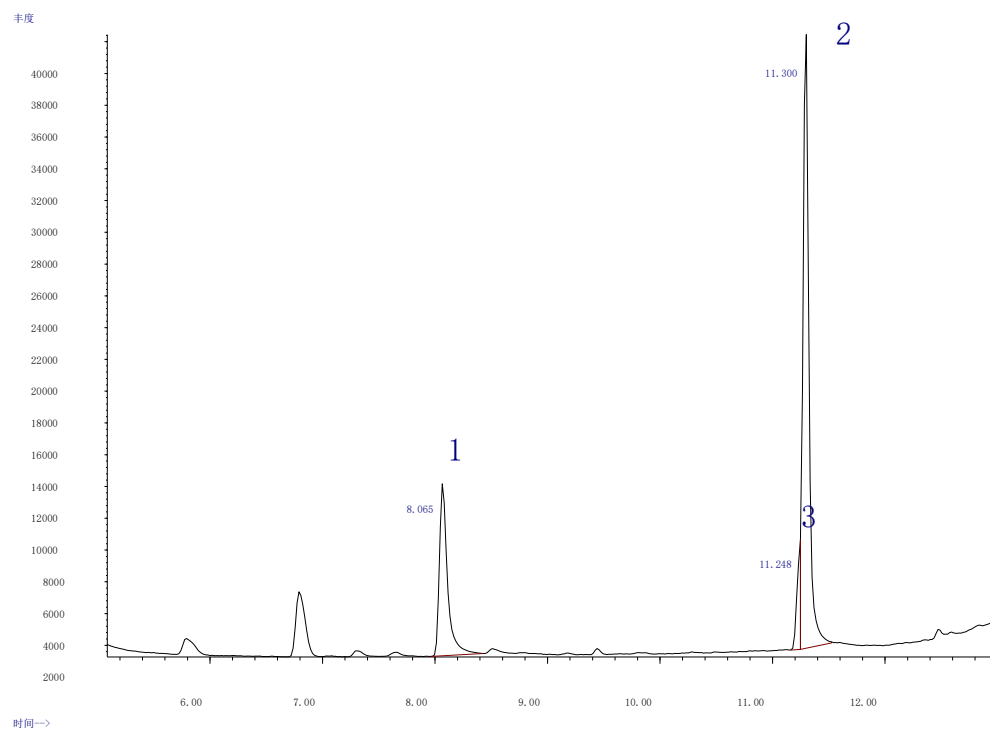


图 C.1 残留物及内标的反应监测 (MRM) 色谱图  
注：1—2-氯乙醇；2—苯乙烯；3—苯乙烯D8