

ICPE-9820 同时测定某疫苗中的铝佐剂和硫柳汞

ICP-150

摘要：使用岛津公司 ICPE-9820 电感耦合等离子体发射光谱仪开发了某疫苗中铝佐剂和硫柳汞同时测定方法，该方法 Al 和 Hg 元素方法检出限为 0.42 mg/L 和 1.40 mg/L，测定灵敏度高。该方法能识别疫苗中微量添加的硫柳汞，比较不同厂家不同批次某疫苗中铝佐剂和硫柳汞含量细微差异，从而评价工艺的差异及稳定性。样品测定结果显示，5 个厂家共计 15 批次疫苗中铝佐剂和硫柳汞均符合 2020 版《中国药典》要求，各厂家不同批次铝佐剂含量一致性良好，但硫柳汞含量呈现明显差异。该方法灵敏度高，稳定性好，检测效率高，适用于疫苗中铝佐剂和硫柳汞的同时测定。

关键词：ICP-OES 疫苗 铝佐剂 硫柳汞

铝佐剂是目前应用最为广泛的人用疫苗佐剂，主要有氢氧化铝和磷酸铝，是疫苗的重要组成部分。有研究表明，铝佐剂用量过低，无法有效吸附抗原；过多的铝佐剂则可能抑制免疫反应。近年来，铝佐剂的整体安全性和不良反应常有报道，并且铝具有一定的神经毒性。

硫柳汞又名乙基汞硫代水杨酸钠，含汞 49.6%，是疫苗常用的防腐剂。它对疫苗中的抗原具有稳定作用，一直被广泛用作生物制品和药品的防腐剂。有研究报道接触大剂量硫柳汞时，会产生较强的毒性；小剂量使用硫柳汞的危险主要为过敏反应。疫苗接种对象大多是新生儿，且接种时间较为集中，而小于 6 个月的婴儿缺乏汞的代谢能力。因此，到目前为止硫柳汞剂量的安全问题仍存在争议。

《中国药典》2020 年版对疫苗中的铝佐剂和硫柳汞做出了明确限量要求，限量值因疫苗种类而异。铝佐剂含量按照通则 3106 化学滴定法测定或采用其他适宜方法检查，通则 3115 第一法采用化学滴定法测定硫柳汞含量，第二法采用原子吸收分光光度法测定硫柳汞含量。化学滴定法测定灵敏度低，样品消耗量大，且此方法以肉眼判断终点，人为误差较大。原子吸收分光光度法测定硫柳汞，需要对硫柳汞进行消解、配备冷汞发生器检测。以上方法均不能同时测定铝佐剂和硫柳汞，操作效率低。

本研究开发 ICP-OES 同时测定铝佐剂和硫柳汞的方法，可在一次测定中同时测出铝佐剂和硫柳汞的含量，方法灵敏度高，用样量少，稳定性好，提高分析效率。

■ 实验部分

1.1 仪器

岛津 ICP-9820 电感耦合等离子体光谱仪。

1.2 实验器皿及试剂

实验所用器皿均使用 (1+1) 硝酸溶液浸泡 24 小时后，用去离子水冲洗，干燥备用；实验用水为去离子水。
HNO₃ (德国 Merck, 分析级)。

Al 元素标准溶液 (1000 mg/L)，GSB G 62006-90(1301)；

Hg 元素标准溶液 (1000 mg/L)，GSB 04-1729-2004；

Au 元素标准溶液 (1000 mg/L)，AccuStandard。

1.3 样品

A 厂家三批次某疫苗 (批号代称：A-1、A-2 和 A-3)，B 厂家三批次某疫苗 (批号代称：B-1、B-2 和 B-3)，C 厂家三批次某疫苗 (批号代称：C-1、C-2 和 C-3)，D 厂家三批次某疫苗 (批号代称：D-1、D-2 和 D-3)，E 厂家三批次某疫苗 (批号代称：E-1、E-2 和 E-3)。

1.4 样品前处理

取 0.10 mL 疫苗样品于 15 mL 离心管中，加入 1000 ppm 的 Au 溶液 20.0 μ L，用 1.00% HNO₃ 定容至 10.0 mL，摇匀后放置于烘箱中，80°C 恒温 24 h，取出摇匀，用 0.45 μ m 滤膜过滤后待测。相同的方法制备空白样品、平行样品和加标样品。

1.5 仪器参数

仪器分析条件见表 1。

表 1 ICP-OES 分析条件

仪器参数	设定值	仪器参数	设定值
高频功率	1.20 kW	等离子体气流速	10.0 L/min
辅助气流速	0.60 L/min	载气流速	0.70 L/min
炬管类型	微型炬管	雾化器类型	同轴
雾化室	旋流	高频频率	27.12 MHz

■ 结果与讨论

2.1 标准曲线溶液配制

使用 1.00 % 硝酸配制 Al 元素标准溶液；使用 1.00 % 硝酸配制 Hg 元素标准溶液，加入浓度为 2.00 mg/L 的 Au 作为稳定剂。标准溶液浓度见表 2。

表 2 分析元素波长及标准溶液浓度

分析元素	波长	标准曲线浓度 (mg/L)						
		STD1	STD2	STD3	STD4	STD5	STD6	STD7
Al	394.403	0	0.50	1.00	2.00	5.00	10.0	20.0
Hg	184.950	0	0.10	0.20	0.50	1.00	2.00	---

2.2 元素标准曲线

标准曲线线性和谱峰轮廓图见 1~2。

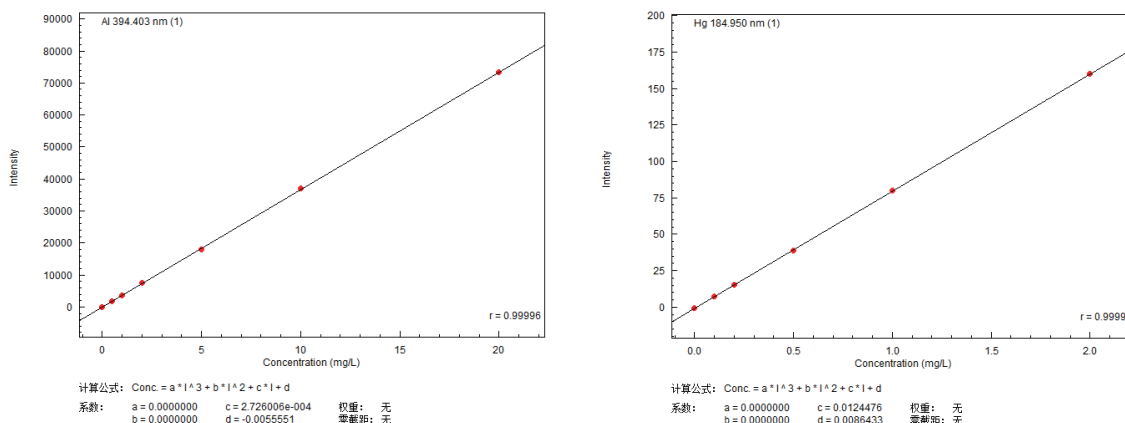


图 1 元素标准曲线图

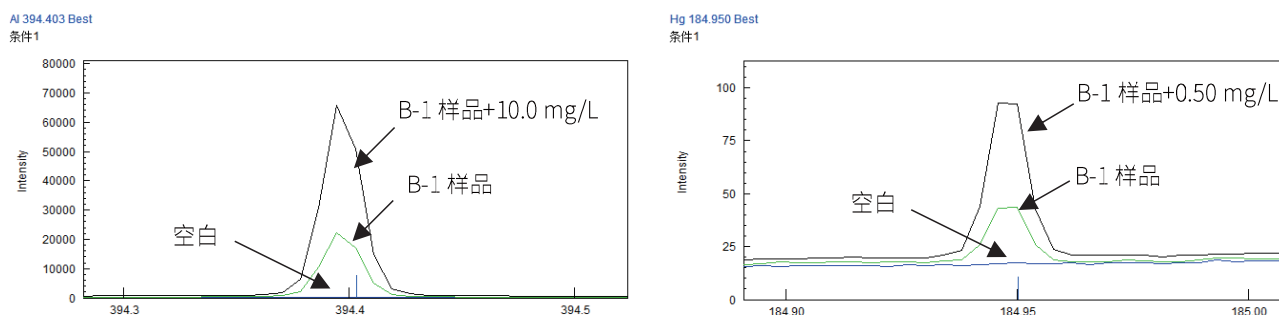


图 2 Al 和 Hg 元素谱峰轮廓图

2.3 方法检出限

按照实验方法对空白溶液进行 6 次测定，以 Al 和 Hg 元素测定结果的 3 倍标准偏差计算检出限，根据样品前处理方法计算方法检出限。Al 元素仪器检出限为 0.0042 mg/L，Hg 元素仪器检出限为 0.014 mg/L；Al 元素方法检出限为 0.42 mg/L，Hg 元素方法检出限为 1.40 mg/L(见表 3)。

表 3 Al 和 Hg 线性相关系数、仪器检出限和方法检出限

元素	线性相关系数 r	仪器检出限 (mg/L)	方法检出限 (mg/L)
Al	0.99998	0.0042	0.42
Hg	0.99999	0.014	1.40

2.4 样品分析结果

取 5 个厂家共计 15 批次疫苗样品，按照“1.4 样品前处理”处理后，使用 ICPE-9820 测定铝和汞的含量，根据铝佐剂和硫柳汞的分子量换算出铝佐剂和硫柳汞的含量，其中铝佐剂分子式以 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 计，分子量为 78；硫柳汞分子量为 404.8。测定结果见表 4。

5 个厂家共计 15 批次某疫苗中氢氧化铝含量为 1.15-1.42 g/L，均满足中国药典限量 1.00-1.50 g/L 要求，各批次测定 RSD 小于 4.00%。C 厂家三批次铝佐剂含量变异系数为 6.25%，其余厂家变异系数均小于 5.00%，铝佐剂含量的批次一致性良好。

A 厂家三批次某疫苗中 Hg 均未检出，表明该厂家疫苗不含硫柳汞。B、C、D、E 各厂家各批次某疫苗均有汞检出，其中 D 厂家各批次疫苗中汞虽有检出，但低于定量限，表明该厂家疫苗只有微量硫柳汞添加。B、C、E 各批次硫柳汞含量为 0.041-0.070 g/L，均符合药典限量 ≤ 0.10 g/L 要求。C 厂家 C-3 批次硫柳汞含量明显低于该厂家其它批次，三批次硫柳汞含量变异系数为 13.9%，其含量批次一致性相对较差；B 和 E 厂家三批次硫柳汞含量变异系数小于 5.00%，各批次硫柳汞含量一致性良好。

表4 铝佐剂和硫柳汞测定结果

样品	铝佐剂					硫柳汞				
	Al 测定结果 (mg/L)	RSD(%) (n=3)	铝佐剂 (g/L)	变异系数 (%)	药典限量 (g/L)	Hg 测定结果 (mg/L)	RSD(%) (n=3)	硫柳汞 (g/L)	变异系数 %	药典限量 (g/L)
A厂	A-1	4.34	1.12	1.25	4.06	N.D	---	---	---	
	A-2	4.23	1.43	1.22		N.D	---	---		
	A-3	4.58	1.97	1.32		N.D	---	---		
B厂	B-1	4.92	1.97	1.42	4.16	0.34	2.55	0.069	4.65	
	B-2	4.58	1.34	1.32		0.31	3.63	0.063		
	B-3	4.93	3.15	1.42		0.32	3.17	0.065		
C厂	C-1	4.70	2.39	1.36	6.25	0.35	2.35	0.070	13.9	
	C-2	4.42	2.56	1.28		1.00-1.50	0.32	4.56	0.065	≤ 0.10
	C-3	4.14	1.58	1.20		0.26	3.34	0.053		
D厂	D-1	3.99	1.65	1.15	2.44	≤ 0.047*	---	---	---	
	D-2	4.16	0.98	1.20		≤ 0.047*	---	---		
	D-3	4.14	1.03	1.20		≤ 0.047*	---	---		
E厂	E-1	4.45	2.88	1.29	4.53	0.21	2.63	0.041	1.40	
	E-2	4.23	0.97	1.22		0.20	1.05	0.041		
	E-3	4.08	2.55	1.18		0.21	1.81	0.042		

备注：N.D 表示未检出；* 表示小于仪器定量限。

选取五厂家某疫苗各一批次，做加标回收试验，其中 A、B、C、D 和 E 厂家各一批次在前处理过程中添加铝 10.0 mg/L，B、C、D 和 E 厂家各批次在前处理过程中添加汞 0.50 mg/L，回收率结果见表 5。铝的加标回收率为 97.5-112%，汞的加标回收率为 93.2-105%，回收率良好。

表5 铝佐剂和硫柳汞加标回收试验结果

样品	铝佐剂				硫柳汞			
	Al 测定结果 (mg/L)	加标量 (mg/L)	加标结果 (mg/L)	回收率 (%)	Hg 测定结果 (mg/L)	加标量 (mg/L)	加标结果 (mg/L)	回收率 (%)
A-1	4.34	10.0	15.2	109	N.D	---	---	---
B-1	4.92	10.0	16.1	112	0.34	0.50	0.87	105
C-1	4.70	10.0	15.5	108	0.35	0.50	0.85	100
D-1	3.99	10.0	14.2	102	≤ 0.047*	0.50	0.51	103
E-1	4.45	10.0	14.2	97.5	0.21	0.50	0.67	93.2

备注：N.D 表示未检出；* 表示小于仪器定量限。

选取五厂家某疫苗各一批次，每一批次平行处理三份样品，做重复性试验考察方法的精密度，结果见表 6。A-1、B-1、C-1、D-1 和 E-1 五批的疫苗铝佐剂含量平行测定 RSD 介于 0.41%-4.02% 之间，B-1、C-1 和 E-1 三批疫苗硫柳汞含量平行测定 RSD 介于 0.84%-2.86% 之间。铝佐剂和硫柳汞测定精密度良好。

表 6 重复性试验结果

样品	铝佐剂			硫柳汞		
	平行测定 (g/L)	平均值 (g/L)	RSD(n=3,%)	平行测定 (g/L)	平均值 (g/L)	RSD(n=3,%)
A-1	1.25			---		
	1.25	1.25	0.46	---	---	---
	1.24			---		
B-1	1.42			0.069		
	1.43	1.42	0.41	0.068	0.069	0.84
	1.42			0.069		
C-1	1.36			0.070		
	1.35	1.34	1.55	0.070	0.069	2.51
	1.32			0.067		
D-1	1.17			---		
	1.16	1.16	0.86	---	---	---
	1.15			---		
E-1	1.29			0.041		
	1.32	1.28	4.02	0.041	0.040	2.86
	1.22			0.039		

■ 结论

使用岛津公司 ICPE-9820 电感耦合等离子体发射光谱仪开发了某疫苗中铝佐剂和硫柳汞同时测定方法，该方法 Al 和 Hg 元素方法检出限为 0.42 mg/L 和 1.40 mg/L。该方法灵敏度高，准确度高，可快速检测出某疫苗中铝佐剂和硫柳汞含量，比较不同厂家不同批次某疫苗中铝佐剂和硫柳汞含量细微差异，从而评价工艺的差异及稳定性。该方法同时测定铝佐剂和硫柳汞，检测效率高，适用于疫苗中铝佐剂和硫柳汞的测定。

岛津应用云

