

# HPLC-ICP-MS 测定疫苗等药品中抑菌剂硫柳汞含量

## ICPMS-109

**摘要：**建立了高效液相色谱分离 - 电感耦合等离子体质谱（HPLC-ICP-MS）联用测定疫苗和滴眼液等药品中抑菌剂硫柳汞的分析方法。样品经离心、去离子水稀释，以 5% 乙腈水溶液（含 0.462% 乙酸铵 +0.12% L- 半胱氨酸）为流动相，C<sub>18</sub> 反向色谱柱分离，使用岛津 LC-20Ai 和 ICPMS-2030 检测。在 5~1000 μg/L（以硫柳汞计）范围内线性回归系数 0.9999，硫柳汞仪器检出限（3S/N）为 1.20 μg/L。分别对疫苗和滴眼剂进行加标回收试验，加标回收率分别为 116% 和 113%。该方法操作简便快捷，灵敏度高，准确性好，适用于疫苗、滴眼液等药品中抑菌剂硫柳汞含量的测定。

**关键词：**HPLC-ICPMS 抑菌剂 硫柳汞 疫苗 滴眼液

硫柳汞（Thiomersal）又名乙基汞硫代水杨酸钠，是一种含汞有机化合物。其分子式为 C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>HgNaO<sub>2</sub>S，汞含量为 49.551%，代谢产物为乙基汞和硫代水杨酸盐。其抑菌作用机理是汞离子与菌体中酶蛋白的巯基结合，使酶失去活性。

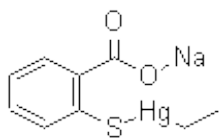


图 1 硫柳汞结构式

作为一种广谱抑菌剂，硫柳汞对疫苗抗原具有稳定作用，广泛应用于疫苗、毒素、抗病毒血清等医用产品中，包括大量接种的百白破疫苗、森林脑炎灭活疫苗等，含量要求不高于 100 mg/L，不同类别疫苗要求有一定差异。此外在注射剂、药用滴眼液中也会用到硫柳汞作为抑菌剂。

## 实验部分

### 1.1 仪器

岛津高效液相色谱仪 LC-20Ai；电感耦合等离子体质谱仪 ICPMS-2030；高速离心机。

### 1.2 分析条件

LC-20Ai 和 ICPMS-2030 仪器分析条件见表 1、表 2。

尽管世界卫生组织、美国医学研究院、美国儿科学会、英国药品安全委员会和欧洲药品评价局均强调，没有证据表明疫苗中硫柳汞的用量会对健康构成风险，但是由于含有毒有害的汞元素，引起公众对硫柳汞使用可能导致汞累积伤害身体的担忧。美国于 2001 年开始在儿童疫苗中不再使用硫柳汞作为抑菌剂，我国目前无停止使用硫柳汞的强制要求。

《中国药典》（2015 版）中疫苗硫柳汞的测定依据通则 3115 双硫脲滴定法和原子吸收分光光度法，滴眼液等按照通则 0512 使用液相色谱法测定。滴定法和原子吸收均需要对样品消解转化为无机汞，操作繁琐费时，液相色谱法灵敏度较低。ICP-MS 检出限低，与液相色谱联用可以实现快速高灵敏检测。

本文采用岛津高效液相色谱 LC-20Ai 与电感耦合等离子体质谱仪 ICPMS-2030 联用分析疫苗、滴眼液等医用制品中抑菌剂硫柳汞的含量。

表 1 液相色谱 LC-20Ai 条件

参数	设定值
色谱柱	Intertsil ODS-SP (C18) 5 μm, 4.6 mm×150mm
流动相	A相: 0.462% 乙酸铵 +0.12% L- 半胱氨酸; B相: 乙腈
流速	1.5 mL/min
柱温	35°C
进样量	20 μL
洗脱程序	等度洗脱 (A: B=95:5)

表 2 ICPMS-2030 条件

参数	设定值	参数	设定值
高频功率	1.20 kW	等离子体气流速	9.0 L/min
辅助气流速	1.10 L/min	载气流速	0.70 L/min
炬管类型	Mini 炬管	雾化器类型	同轴雾化器
雾化室	旋流雾室	雾化室温度	5°C
采样深度	5.0 mm	高频频率	27.12 MHz

## ■ 样品前处理

将样品 8000rpm 离心 5min, 取适量上清液、去离子水稀释混匀, 0.22 μm 滤膜过滤后待测。

## ■ 结果与讨论

### 3.1 色谱分离图

对空白进行考察排除系统干扰, 50 μg/L 硫柳汞标准溶液色谱图见图 2 (单位 kcps), 硫柳汞保留时间为 2.67 min。

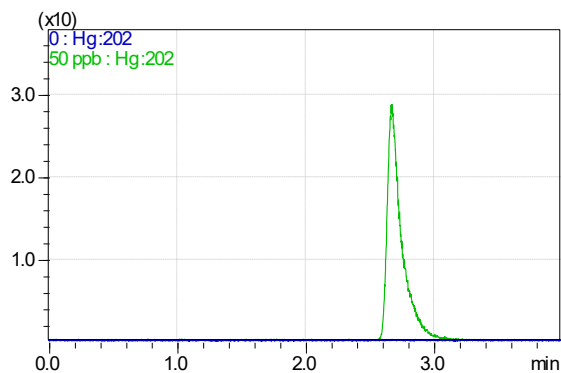


图 2 硫柳汞色谱图

### 3.2 标准曲线和检出限

准确取硫柳汞 (100 mg/L, 美国 AccuStandard) 标准溶液适量, 以纯水逐步稀释为 0、5、20、50、100、200、500、1000 μg/L (以硫柳汞计) 系列浓度的标准溶液。

根据色谱及质谱分析条件, 依次测定各标准点, 以硫柳汞浓度对峰面积做线性回归曲线, 标准曲线如图 3 所示, 在 5~1000 μg/L 范围内, 线性相关系数 0.9999。

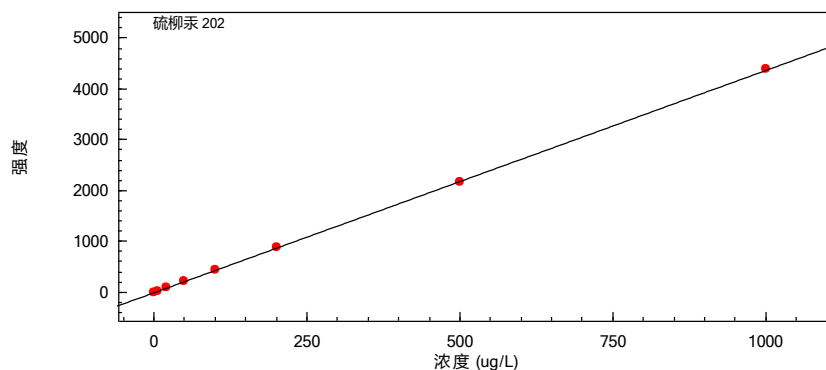


图 3 硫柳汞标准曲线 ( $r=0.9999$ )

对浓度为  $5\ \mu\text{g/L}$  的硫柳汞溶液考察信噪比 (见图 4)，以三倍信噪比 ( $3S/N$ ) 峰高对应浓度作为检出限，硫柳汞仪器检出限为  $1.20\ \mu\text{g/L}$ 。分别对  $10\ \mu\text{g/L}$  和  $100\ \mu\text{g/L}$  硫柳汞进行重复测定，结果见表 3，相对标准偏差 (RSD) 为 0.82% 和 0.56%，对高低浓度具有良好重复性。

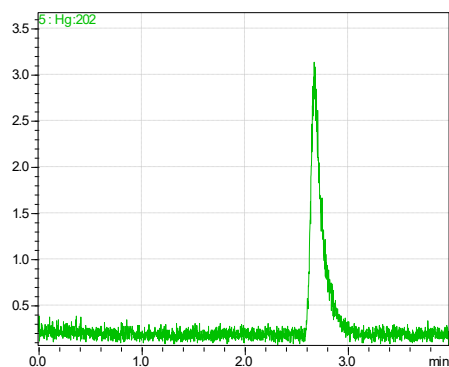


图 4 浓度为  $5\ \mu\text{g/L}$  的硫柳汞色谱图

表 3 重复性测试结果

浓度 ( $\mu\text{g/L}$ )	测定值 ( $\mu\text{g/L}$ )	RSD(% , n=6)
10.0	9.91	0.82%
100	103	0.56%

### 3.3 样品测试结果

取市售疫苗和眼药水，按照前处理步骤处理后 HPLC-ICP-MS 分析，并进行加标回收试验。共测试 9 批次疫苗和 3 批次滴眼液样品，7 批次疫苗和 2 批次滴眼液未检出。抑菌剂为硫柳汞的疫苗和滴眼液样品谱图和测定结果分别见图 5 和表 4。如结果所示，疫苗测定结果小于中国药典中硫柳汞限值  $100\ \text{mg/L}$ ，眼药水结果为  $11.3\ \text{mg/L}$ ，与产品标识硫柳汞浓度 0.001% ( $10\ \text{mg/L}$ ) 较一致，疫苗和眼药水加标回收率为 116% 和 113%。

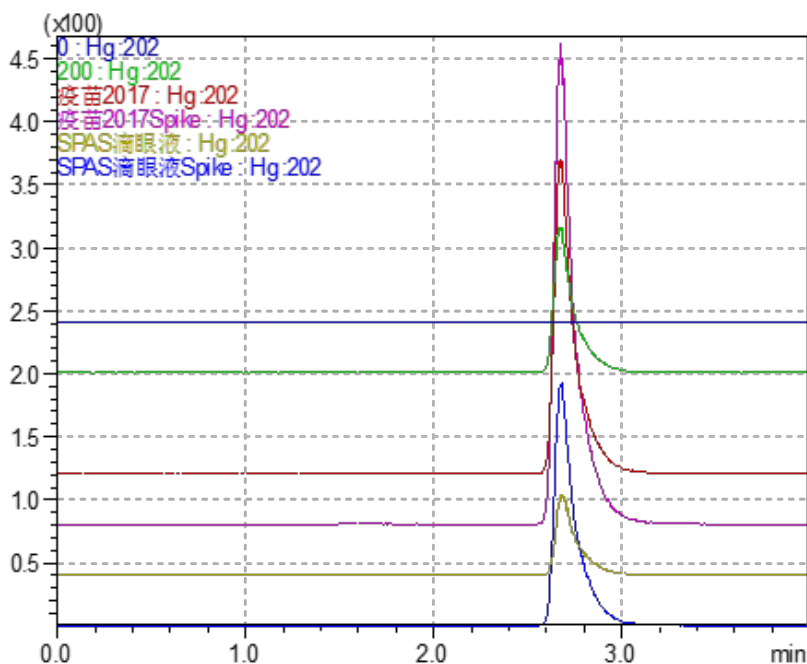


图 5 疫苗及滴眼液结果谱图

表 4 疫苗和滴眼液中硫柳汞测试结果及加标回收率

名称	测定值 ( $\mu\text{g/L}$ )	稀释 倍数	结果 ( $\text{mg/L}$ )	RSD ( $n=3$ )	加标量 ( $\mu\text{g/L}$ )	测定值 ( $\mu\text{g/L}$ )	回收率 (%)
疫苗 2017#	430	200	86.1	0.39%	200	663	116
疫苗 2018#	441	200	88.2	0.45%	-	-	-
SPAS 滴眼液	113	100	11.3	0.42%	200	339	113

## 结论

防腐剂（抑菌剂）是医用制品中必不可少的添加剂，可以有效防止细菌滋生、影响产品使用寿命，保障人体健康。硫柳汞是疫苗、滴眼液等药品中使用的抑菌剂之一，为了保证抑菌剂维持在合理的浓度范围，需要对其含量进行准确测定。本文建立了疫苗和滴眼液中硫柳汞测定的高效液相色谱 - 电感耦合等离子体质谱联用法（HPLC-ICPMS）。该方法检出限为  $1.2 \mu\text{g/L}$ ，适用于疫苗等医用产品中抑菌剂硫柳汞的测定，一定程度上可以弥补滴定法、原子吸收法等技术的不足。