

吸附无细胞百白破联合疫苗中硫柳汞含量测定的 不确定度评定

王 玮¹, 杨雁霞¹, 罗文君², 王永蓉^{1*}

(1. 云南省食品药品监督检验研究院, 工业和信息化部产业技术基础公共服务平台, 昆明 650101;
2. 云南总队综合信息保障中心, 昆明 650000)

摘要: **目的** 建立滴定法测定吸附无细胞百白破疫苗硫柳汞含量不确定度评定方法, 发现引起较大不确定度的来源, 提高实验室检测能力。 **方法** 采用2020年版《中华人民共和国药典》通则3115第一法滴定法, 建立数学模型分析检测过程中不确定度的来源, 并合成标准不确定度及扩展不确定度。 **结果** 在影响硫柳汞含量测定中, 各影响因素均有一定的作用, 经A类评定和B类评定, 求得扩展不确定度 $U_{rel}(\text{含量}) = 4.72\% (K=2)$ 。 **结论** 经对各因素引入的不确定度评定发现, 引入较大不确定度的因素主要是供试品的滴定过程, 可在后续方法改进中考虑滴定过程处在低温等条件下。

关键词: 吸附无细胞百白破联合疫苗; 硫柳汞含量测定; 滴定法; 不确定度

Evaluation of uncertainty in the determination of thiomersal content in Adsorbed Diphtheria, Tetanus, and Acellular Pertussis Combined Vaccine

WANG Wei¹, YANG Yan-Xia¹, LUO Wen-Jun², WANG Yong-Rong^{1*}

(1. Yunnan Provincial Institute for Food and Drug Control, MIIT Public Service Platform for Industrial Technology Foundation, Kunming 650101, China; 2. Yunnan Corps Comprehensive Information Security Center, Kunming 650000, China)

ABSTRACT: Objective To establish a titration method for evaluating the uncertainty in the determination of thiomersal content in adsorbed diphtheria, tetanus, and acellular pertussis combined vaccine, and to identify the sources of significant uncertainty, improve laboratory detection ability. **Methods** The titration method was established according to the first method of the General Rules 3115 in the 2020 edition of the *Pharmacopoeia of the People's Republic of China*, a mathematical model was established, and the sources of uncertainty in the detection process were analyzed to synthesize the standard uncertainty and extended uncertainty. **Results** In the determination of thiomersal content, all influencing factors have a certain effect. After type A evaluation and type B evaluation, the extended uncertainty $U_{rel} = 4.72\% (K=2)$ was obtained. **Conclusion** After evaluating the uncertainty introduced by each factor, it was found that the factors introducing significant uncertainty are mainly the titration process of the test sample. It is suggested that the titration process in low-temperature and other conditions be considered in subsequent method improvements.

KEYWORDS: Adsorbed Diphtheria, Tetanus, and Acellular Pertussis Combined Vaccine; thiomersal; titration method; uncertainty

0 引言

目前, 在实验室测量行业中, 测量结果包含其不确定度方可完整、有意义已成为业内共识, 不确定度主要用来表示测量结果的分散性, 其大小可表现测量结果的可靠性^[1-3], 而在实验

室中对检测过程进行不确定度评定利于实验人员识别并评定出对检测过程带来较大不确定度的因素, 并对引起较大不确定度的因素提出措施进行改进, 减少实验的误差, 可更好地提高实验结果的可靠性, 提升实验室检测能力。尤其是近几年我国生物制品快速发展, 成为药品的重要组成部分, 由于生物制品的

* 通信作者: 王永蓉, 硕士, 主管药师, 研究方向为生物制品批签发检验。E-mail: zzs202310@126.com

* Corresponding author: WANG Yong-Rong, Master, Pharmacist in Charge, Yunnan Provincial Institute for Food and Drug Control, MIIT Public Service Platform for Industrial Technology Foundation, Kunming 650101, China. E-mail: zzs202310@126.com

活性物质主要为大分子活性物质,所用的检测手段和检测方法普通的化学药和中药都有很大的区别^[4],准确度、精密密度等方面的表现较化学药品的方法要更难提高,因此,不确定度评定在生物制品中的应用更为重要。

吸附无细胞百白破联合疫苗在生产工艺中会使用硫柳汞,主要用在工作菌株对数生长后期或静止期前期作为杀菌剂^[5],硫柳汞是一种含有乙基汞的化合物,研究发现其对疫苗的质量稳定性以及安全性有一定的影响^[6-9],因此,需检测吸附无细胞百白破联合疫苗成品中硫柳汞的残留量。目前,检测硫柳汞的法定方法收录在2020年版《中华人民共和国药典》三部,主要有滴定法和原子吸收分光光度法,尽管仪器法较滴定法优势较多^[10],但由于滴定法成本较低,且操作方便,很多企业仍采用滴定法,因此对该方法进行研究仍有必要性。滴定法目前操作已经比较成熟,但由于药典中对该方法的细节没有详细描述,且涉及消化过程,所用溶剂均为有机试剂,影响实验结果的因素较多,因此,对该实验过程进行不确定度评定就显得尤为必要,经文献查阅,目前没有对滴定法测硫柳汞含量进行不确定度分析的研究,因此,本文建立滴定法测定硫柳汞含量的不确定度评定方法,使实验室检验过程及检验结果更为科学可靠^[11]。

1 材料与方法

1.1 试剂

氯化汞(≥99.5%,AR级,国药集团化学试剂有限公司);双硫脲(5g/包,AR级,国药集团化学试剂有限公司);吸附无细胞百白破联合疫苗成品,某企业生产的一批次成品。

1.2 仪器

数字瓶口滴定仪(Titrette,25 mL,BRAND);移液器(10~100 μL、100~1000 μL,BRAND);电子天平[十万分之一,MCA125P-2CCN-U-QP1,赛多利斯科学仪器(北京)有限公司]。

1.3 溶液配制

1 mg/mL 标准汞溶液配制:精密称取氯化汞 0.135 g,用 0.5 mol/L 硫酸溶液溶解,稀释定容至 100 mL 容量瓶中,混匀。

50 μg/mL 标准汞溶液:取 1 mg/mL 标准汞溶液 100 μL,加入 0.5 mol/L 硫酸溶液 1900 μL。

0.05% 双硫脲滴定液:精密称取 50 mg 的双硫脲,加入三氯甲烷溶解并定容至 100 mL 容量瓶中,混匀。

0.00125% 双硫脲滴定液:取 0.05% 双硫脲滴定液 2500 μL 于 100 mL 容量瓶中,用四氯化碳定容,混匀。

1.4 试验方法

(1) 消化:精密量取供试品 1000 μL,置于试管中,分别加入硫酸 2 mL、8.0 mol/L 硝酸溶液 0.5 mL,混匀,盖好盖子,置于 85~90°C 水浴中加热 1 h。冷却后加水 40 mL,再加 20% 盐酸羟胺溶液 5 mL。

(2) 滴定:用水 40 mL 将上述消化后溶液分数次冲洗并转移至 125 mL 分液漏斗中,用 0.00125% 双硫脲滴定液滴定,每次加入滴定液后,振荡 10 s,静置分层,弃去四氯化碳层,继续滴定,直至双硫脲滴定液绿色不变,即为终点。

(3) 标化双硫脲滴定液:精密量取标准汞溶液 1 mL 于 125 mL 分液漏斗中,加硫酸 2 mL、水 80 mL 和 20% 盐酸羟胺溶液 5 mL,自“(2)滴定”中“用双硫脲滴定液滴定”起同法操作^[1]。

1.5 数学模型

$$\text{硫柳汞含量}(\%) = \frac{V_1 \times 0.050 \times 2.02}{V_2 \times V_3 \times 1000} \times 100 \quad (1)$$

式中 V_1 为供试品消耗滴定液的体积, mL; V_2 为标准汞溶液消耗滴定液的体积, mL; V_3 为供试品的体积, mL; 0.05 为标准汞溶液的浓度, mg/mL; 2.02 为常数(1 g 汞相当于 2.02 g 硫柳汞)。

2 结果与分析

2.1 测量不确定度的评定

不确定度的来源根据实验过程和数学模型进行分析,本实验中,除称取、配制标准品,称取、配制滴定液,标化,量取供试品会引入不确定度外,由于供试品的前处理过程较为繁琐,要将供试品置于 85~90°C 水浴中加热 1 h,冷却后加水 40 mL,再加 20% 盐酸羟胺溶液 5 mL。用水 40 mL 将上述消化后溶液分数次冲洗并转移至 125 mL 分液漏斗中,此过程也会引入较大不确定度。因此,确定不确定度来源,由以下五种因素引起:①配制 1 mg/mL 汞溶液引入的不确定度;②配制 50 μg/mL 标准汞溶液引入的不确定度;③双硫脲滴定液的标化;④滴定供试品引入的不确定度;⑤量取供试品体积引入的不确定度。

2.2 测量不确定度分析

2.2.1 配制 1mg/mL 的汞溶液不确定度

所用天平为十万分之一天平,检定证书称量允差为 ±0.00001 g,视为矩形分布($k = \sqrt{3}$),则天平称取标准品 0.13500 g 的相对称量不确定度 $u_{\text{rel}}(M)$ 见式(2)

$$u_{\text{rel}}(M) = \frac{0.00001}{\sqrt{3} \times 0.13500} \quad (2)$$

100 mL A 级容量瓶的最大允许误差为 0.10 mL,按三角形分布,其相对不确定度 $u_{\text{rel}}(V_{\text{容}})$ 见式(3)

$$u_{\text{rel}}(V_{\text{容}}) = \frac{0.10}{\sqrt{6} \times 100} \quad (3)$$

合成配制 1 mg/mL 汞溶液的相对不确定度 $u_{\text{rel}}(\text{标}_1)$ 见式(4)

$$u_{\text{rel}}(\text{标}_1) = \sqrt{\left(\frac{0.00001}{\sqrt{3} \times 0.13500}\right)^2 + \left(\frac{0.10}{\sqrt{6} \times 100}\right)^2} = 0.0410\% \quad (4)$$

2.2.2 配制 50μg/mL 标准汞溶液的不确定度

所使用移液器分别为 100 μL 和 1000 μL 移液器,100 μL 的移液器最大允许误差 2.0 μL,1000 μL 移液器最大允许误差为 10 μL,为均匀分布,100 μL 的移液器引入的相对不确定度为 $\frac{2}{\sqrt{3} \times 100}$;1000 μL 移液器引入的相对不确定度为 $\frac{10}{\sqrt{3} \times 1000}$,

合成移液器引入的相对不确定度 $u_{\text{rel}}(\text{标}_2)$ 见式(5)

$$u_{\text{rel}}(\text{标}_2) = \sqrt{\left(\frac{2}{\sqrt{3} \times 100}\right)^2 + \left(\frac{10}{\sqrt{3} \times 1000}\right)^2 + \left(\frac{10}{\sqrt{3} \times 1000}\right)^2} = 1.4142\% \quad (5)$$

2.2.3 双硫脲滴定液的标化

数字瓶口滴定仪的校准依据参照 JJG 646—2006《移液器检定规程》,该规程没有规定 25 mL 校准点的容量允差,因此本研究用 A 类评定评价标化过程的不确定度。

双硫脲滴定液标化引起的不确定度:配制 50 μg/mL 标准汞溶液,用双硫脲滴定液滴定,平行重复 4 次测定,结果见表 1。

表 1 汞标准液消耗滴定液体积及其不确定度

Table 1 Volume of titrant consumed by mercury standard solution and its uncertainty

标准汞溶液浓度 50 μg/mL	1	2	3	4
使用滴定液体积(mL)	35.20	35.10	36.25	36.25
平均值(mL)	35.70			
标准偏差(mL)	0.6364			

平行测定 4 次,消耗滴定液体积的平均值为 35.70 mL,标准偏差 $s = 0.6364$,相对不确定度 $u_{\text{rel}}(C_{\text{标}1})$ 见式(6)。

$$u_{\text{rel}}(C_{\text{cal1}}) = \frac{s}{2 \times 35.70} = 0.8913\% \quad (6)$$

2.2.4 滴定液滴定供试品引起的不确定度

取吸附无细胞百白破疫苗同一批次 8 支, 混匀, 取 1000 μL , 用双硫脲滴定液滴定, 平行 4 次测定, 结果见表 2。

表 2 供试品消耗的滴定液体积及其不确定度

Table 2 Volume of titrant consumed by the test sample and its uncertainty

供试品	1	2	3	4
使用滴定液体积(mL)	4.53	4.24	4.51	4.51
标准汞消耗滴定液体积平均值(mL)	35.15			
供试品硫柳汞含量(%)	0.00130	0.00122	0.00130	0.00130
标准偏差(%)	0.00004			

平行测定 4 次, 供试品硫柳汞含量的平均值为 0.00128, 标准偏差 $s=0.00004$, 平均值的相对不确定度 $u_{\text{rel}}(C_{\text{cal2}})$ 见式 (7)。

$$u_{\text{rel}}(C_{\text{cal2}}) = \frac{s}{2 \times 0.00128} = 1.5625\% \quad (7)$$

2.2.5 所取供试品的体积

B 类不确定度, 使用 100~1000 μL 移液器, 经证书查询, 1000 μL 移液器最大允许误差为 10 μL , 均匀分布, 1000 μL 移液器引入的相对不确定度为 $u_{\text{rel}}(V_{\text{移}})$ 见式 (8)。

$$u_{\text{rel}}(V_{\text{移}}) = \frac{10}{\sqrt{3} \times 1000} = 0.5774\% \quad (8)$$

(1) 合成标准不确定度 u_c

$$u_c = \left[u_{\text{rel}}(\text{标}_1)^2 + u_{\text{rel}}(\text{标}_2)^2 + u_{\text{rel}}(c_{\text{cal}})^2 + u_{\text{rel}}(\text{重复})^2 + u_{\text{rel}}(V_{\text{移}})^2 \right]^{\frac{1}{2}}$$

$$= \left(0.0410^2 + 1.4142^2 + 0.8913^2 + 1.5625^2 + 0.5774^2 \right)^{\frac{1}{2}} \times 100\%$$

$$= 2.36\%$$

(2) 扩展不确定度 U_{rel}

在影响硫柳汞含量测定中, 各影响因素均有一定的作用, 按正态分布计算, 取包含因子 $K=2$ (置信区间约为 95%), 求得扩展不确定度 $U_{\text{rel}}(\text{含量}) = u_c \times K = 2.36\% \times 2 = 4.72\%$ 。

3 讨论与结论

通过分析滴定法测定硫柳汞含量全过程, 确定不同不确定度的来源, 并经计算得出, 双硫脲滴定液的标化和供试品的滴定引起的不确定度较其他因素大, 分析标化和滴定的实验操作过程, 思考较易引入较大不确定度的因素有以下几个方面: (1) 滴定法的标准操作规程“用 0.00125% 双硫脲滴定液滴定, 每次加入滴定液后, 振摇 10 s, 静置分层, 弃去四氯化碳层, 继续滴定, 直至双硫脲滴定液绿色不变, 即为终点”, 较多的弃去四氯化碳分层的操作, 而使用分液漏斗弃去分层的操作较为不方便, 人为控制分液漏斗开关, 有可能会造成每次弃去操作时过多弃去上清层, 造成每次操作结果变化较大, 重复性较差, 后续研究可从改换其他工具代替分液漏斗或滴定程序, 例如换成移液器移取, 避免多次弃去四氯化碳层操作, 造成较大的不确定度; (2) 双硫脲滴定液在配制时配制液和稀释液分别为三氯甲烷和四氯化碳, 都为有机挥发物, 滴定液中的四氯化碳对光、空气、高温不稳定, 如果滴定时间较长, 或温度较高, 可能会

产生由于溶剂挥发改变双硫脲滴定液浓度, 这种现象已有报道, 滴定液用量随实验时间延长而明显增加, 重复性差, 而在 0°C、完全避光的情况下, 快速滴定会有较好的重复性。因此, 在测定过程中尽量选择低温、完全避光、尽量延长待测样品水浴消化的时长, 甚至到 4 h, 且滴定时间不宜过长, 充分振摇等措施会提高测量的重复性。滴定法测硫柳汞含量因其不需要使用特殊仪器设备、成本低廉等优势而被很多企业一直采用, 但其手工操作较多, 引入不确定度的因素也较高, 且操作过程中工作人员会接触三氯甲烷、四氯化碳等有害物质, 因此, 部分厂家开始寻求更为快速简单的仪器法, 某些非生物制品类产品例如化妆品或化学药物也已探索高效液相色谱法测硫柳汞含量的可能性。尽管仪器法目前在精密度以及准确度方面较滴定法有优势, 但仍存在不足, 因此, 提高硫柳汞含量测定可靠性的方法仍需继续探索并完善。本研究对吸附无细胞百白破联合疫苗硫柳汞含量使用的滴定法测定的不确定度进行评定, 建立滴定法测定硫柳汞含量的不确定度评定方法, 探索实验过程中引入不确定度较大的因素, 并经文献查阅确认, 以期在后续实验中对引起较大不确定度的这些因素加以改进, 减少误差、规范操作, 使实验结果可靠。

参考文献

- [1] 张子安, 张永强, 丁明理. 对深度学习中标定位不确定度评定的讨论[J]. 测控技术, 2024, 43(03): 1-8, 33.
- [2] 姜盟, 汤洁, 石照耀. 蜗轮副双啮仪测量不确定度评定软件开发[J]. 测控技术, 2022, 41(08): 109-115.
- [3] 李仁杰, 李飞, 林鑫, 等. TDLAS 技术温度测量的不确定度分析方法研究[J]. 测控技术, 2020, 39(09): 10-14, 19.
- [4] 侯梦妮, 谢珍, 刘柱, 等. 不确定度评定在药品检验中的研究进展[J]. 海峡药学, 2018, 30(06): 54-57.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2020 年版, 二部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020, 5.
- [6] 张秀丽, 张志刚, 赵勤俭. 硫柳汞对疫苗抗原活性的影响及其作用机制[J]. 中国生物制品学杂志, 2023, 36(01): 119-123.
- [7] 李秀英. 含有硫柳汞的疫苗可能有危险[J]. 传染病信息, 1999, (04): 190.
- [8] 何鹏, 梁争论. 硫柳汞防腐剂在用人疫苗中的应用[J]. 中国生物制品学杂志, 2013, 26(01): 135-138, 143.
- [9] HORNIG M, CHIAN D, LIPKINWI. Neurotoxic effects of postnatal thimerosal are mouse strain dependent[J]. Mol Psychiatry, 2004, 9(09): 833-845.
- [10] 田文莉, 陈天泉, 万亚芬. 对中国药典中硫柳汞含量测定方法的优化[J]. 药物分析杂志, 2011, 31(10): 1990-1992.
- [11] 王玉, 王思寰, 李文莉. 不确定度评定与药品检验[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2021, 4.

作者简介

王玮, 硕士, 主管药师, 研究方向为生物制品批签发检验。
王永蓉, 硕士, 主管药师, 研究方向为生物制品批签发检验。