

禽用疫苗防腐劑含量及含濕度測定報告

葉修如*、張家禎、許天來、趙欣如、邱文鴻、吳建志、鄭懋勁

行政院農業委員會家畜衛生試驗所動物用藥品檢定分所

摘要

本研究以 94 年 4 月至 95 年 3 月送檢之禽用疫苗共 427 批為樣本，疫苗種類分別為新城病、傳染性支氣管炎、傳染性華氏囊炎、傳染性鼻炎及產卵下降症等五種疾病之單價或混合疫苗，對禽用不活化疫苗進行的甲醛及硫柳汞含量檢測，而禽用活毒疫苗方面則檢測其含濕度，檢測所得數據結果進行變異數統計分析 (analysis of variance, ANOVA)，以了解與比較各疫苗廠牌疫苗的差異。於甲醛方面，共分析 17 組 227 個樣本，組間 P 值小於 0.01 ($P = 8.92 \times 10^{-53}$)，各廠牌間甲醛含量具顯著性差異，其中國產疫苗甲醛含量高於 0.1% 者佔 83.33%，進口疫苗佔 9.09%，顯示國產禽用不活化疫苗普遍添加甲醛為防腐劑。於硫柳汞方面，共分析 16 組 168 個樣本，組間 P 值大於 0.05 ($P = 0.0951$)，國內外各廠牌間硫柳汞含量無顯著性差異。於含濕度方面，共分析 17 組 200 個樣本，組間 P 值大於 0.05 ($P = 0.6696$)，國內外各廠牌間含濕度含量無顯著性差異。

關鍵詞 禽用疫苗、防腐劑、甲醛（蟻醛）、硫柳汞、含濕度

緒言

我國動物用生物藥品之管理，係採逐批檢驗方式，亦即不同批次之疫苗分別進行檢定。依據農委會公告之「動物用藥品檢驗標準」規定，無論國產或進口，不活化疫苗檢定時皆須檢驗防腐劑含量，而活毒疫苗皆須檢測其含濕度。以防腐劑含量標準而言，並非每種疫苗之標準皆一致。以禽用不活化疫苗甲醛含量為例，新城病疫苗必須為 0.2% 以下，雞傳染性鼻炎疫苗則為 0.25%，而傳染性華氏囊炎疫苗則須 0.3% 以下。至於使用硫柳汞防腐者，各不同疫苗的硫柳汞含量規定皆為 0.01% 以下。此外，亦有部份疫苗如傳染性支氣管炎疫苗及產卵下降症疫苗，於「動物用藥品檢驗標準」中並未規定其防腐劑含量。至於活毒疫苗則須檢驗濕度含量，疫苗內含濕度依照規定須為 4% 以下。不活化疫苗添加防腐劑或活毒疫苗之乾燥，目的皆為延長疫苗之有效期限，故此二項

試驗對疫苗之品質監測相當重要。本實驗室每年接檢之逐批檢驗疫苗批數約 1,500 批，疫苗種類分別為禽用、豬用、牛用及小動物用等，其中以禽用疫苗檢驗批數最多，為了解國產與進口禽用不活化疫苗之防腐劑添加情形，以及為探討國產與進口禽用活毒疫苗含濕度品質，本報告收集最近一年之禽用疫苗檢定之防腐劑、含濕度之檢測數據，進行統計分析比較，以掌握國產疫苗之品質狀況。

材料與方法

疫苗

以 94 年 4 月至 95 年 3 月各動物用藥品主管機關所送檢之禽用疫苗為樣本。疫苗種類為新城病、傳染性支氣管炎、傳染性華氏囊炎、傳染性鼻炎及產卵下降症等五種疾病之單價或混合疫苗。挑選送檢批數 3 批以上之廠商，進行檢驗數據之 ANOVA 統計分

*抽印本索取作者
行政院農業委員會家畜衛生試驗所

析。

不活化疫苗前處理 (檢體)

取疫苗 1 mL 加入 10% 氯化鈉 2 mL 及氯仿 3 mL, 混合均勻。以 1000g 離心 5 分鐘後, 取水層至另一離心管中, 加二次蒸餾水至 5 mL。

甲醛 (formaldehyde) 含量測定方法

依據日本之檢驗方法[5], 取檢體及 5%、10%、15%、20% 與 25% 之福馬林標準液各 0.1 mL, 每管分別加入冰醋酸/醋酸鉍混合液 2 mL, 再加入乙酰丙酮 (acetylacetone) 溶液 2 mL, 混合均勻, 置於 60°C 加熱 15 分鐘, 再以冷水冷卻 5 分鐘。放置於室溫 20 分鐘後, 以分光光度計 410 nm 測定吸光值。

硫柳汞 (thimerosal) 含量測定方法

1. 依據日本之檢驗方法[4], 取硫柳汞標準液各 0、2.5、5.0 及 7.5 mL, 每管加入二次蒸餾水至 10 mL 備用。
2. 取檢體及各 0、25%、50% 及 75% 之標準液各 0.5 mL, 各自加入二次蒸餾水至 5 mL。
3. 每管加入硫酸溶液 5 mL 及雙硫脲溶液 (dithizone) 10 mL, 激烈震盪後靜置, 去除水層, 再各加入二次蒸餾水 10 mL, 激烈震盪後靜置, 棄上層液, 加入氨水溶液 10 mL, 激烈震盪後靜置, 棄上層液, 留下黃色下層液。
4. 每管取 1 mL 以分光光度計 480nm 測定吸光值。

含濕度試驗方法

環境溼度需以除濕機控制於 55% 以下, 方可開始進行試驗, 本實驗室使用美國 CEM 公司微波溼度測定儀 (LabWave 9000), 取待測疫苗粉末於預先乾燥之試紙上, 以試藥匙壓碎並均勻平鋪於紙上, 再覆一層試紙, 放入測定儀中, 測定儀以微波加熱使水分蒸發, 當重量不再減少時, 儀器即停止加熱並計算水分含量。

結果

甲醛含量測試

選取近一年內送檢疫苗中總批數超過 3 批以上之廠商, 國產疫苗廠商共計 6 家 (甲 - 己), 進口疫苗廠商共計 11 家 (A - K), 以廠商為單位, 檢測各批次疫苗甲醛含量共計 227 批次, 計算檢測數值之平均值 (mean) 及變異數 (variance), 並以 ANOVA 進行組間變異數分析, 結果如表一及圖一。所有不活化疫苗之甲醛含量皆低於 0.25% 並合於標準, 國內廠之甲醛含量平均值介於 0.0858% 至 0.2262% 之間, 變異數介於 8.62×10^{-4} 及 5.07×10^{-3} 之間, 國外廠之甲醛含量平均值介於 0.0058% 至 0.1018% 之間, 變異數介於 2.57×10^{-5} 及 2.42×10^{-3} 之間, 國內外各組間 P 值小於 0.01 ($P = 8.92 \times 10^{-53}$), 表示各廠牌間甲醛含量具顯著性差異。另國產疫苗甲醛含量高於 0.1% 者佔 83.33%, 進口疫苗佔 9.09%, 顯示國產禽用不活化疫苗普遍添加甲醛。

硫柳汞含量測試

選取近一年內送檢疫苗中總批數超過 3 批以上之廠商, 國產疫苗廠商共計 6 家 (甲 - 己), 進口疫苗廠商共計 10 家 (A - J), 以廠商為單位, 檢測各批次疫苗硫柳汞含量共計 168 批次, 計算檢測數值之平均值 (mean) 及變異數 (variance), 並以 ANOVA 進行組間變異數分析, 結果如表二及圖二。所有不活化疫苗之硫柳汞含量皆於 0.01% 以下, 合於標準, 國內廠之硫柳汞含量平均值介於 0.0008% 至 0.0011% 之間, 變異數介於 1.65×10^{-8} 及 2.32×10^{-7} 之間, 國外廠之硫柳汞含量平均值介於 0.0007% 至 0.0014% 之間, 變異數介於 9.11×10^{-9} 及 7.39×10^{-7} 之間, 國內外各組間 P 值大於 0.05 ($P = 0.0951$), 表示各廠牌間硫柳汞含量無顯著性差異。

含濕度測試

選取近一年內送檢活毒疫苗總批數超過 3 批以上之廠商, 國產疫苗廠商共計 3 家 (甲 - 丙), 進口疫苗廠商共計 14 家 (A - N), 以廠商為單位, 檢測各批次疫苗含濕度共計 200 批次, 計算檢測數值之平均值 (mean) 及變異數 (variance), 並以 ANOVA 進行組間變異數分析, 結果如表三及圖三。活毒疫苗

之含濕度皆於 4% 以下並合於標準，國內廠之平均值分別為 2.48%、2.83% 及 3.14%，變異數為 0.7605、0.2698 及 0.2224；國外廠平均值介於 2.39% 至 3.33% 之間，變異數介於 0.0184 至 1.4326 之間，國內外各組間 P 值大於 0.05 ($P = 0.6696$)，表示各廠牌間疫苗含濕度無顯著性差異，顯示國產活毒疫苗之乾燥技術已可追上國際水準。

討論

由疫苗檢定結果與統計分析顯示，國內禽用不活化疫苗之防腐劑以添加甲醛為主（83.33%），而國外廠商使用甲醛之廠商並不如國內普遍（9.07%）。雖然國內廠添加甲醛的劑量皆合乎標準，普遍而言，批次間之變異數仍較國外廠高，因此品管上仍有進步的空間。一般動物用疫苗中添加甲醛的主要目的為使病毒或細菌不活化，同時確保於有效期限內，疫苗能維持應有的效力及安全性。檢測甲醛之方法很多，以 VICH 的方法[8]及 NVSL 之 Ferric chloride 方法[7]為例，需使用氯化鐵（ferric chloride）、磺胺酸（sulphamic acid）、methanol、methylbenzothiazolone、hydrazine hydrochloride 等化學物質，除去溶液配製的時間，單就疫苗與反應試劑之反應時間至少需 75 分鐘；而 NVSL 之 Schiff 方法[5]需使用鹽酸溶液不僅危險且必須於化學抽氣櫃中操作，故本實驗室參考日本的方法[4]，因使用之化學藥品毒性較低，且作用時間需 40 分鐘，較其他方法短，適合於大量樣品之檢驗，以節省時效。

疫苗中添加硫柳汞作為抗菌防腐已有相當久遠的歷史，由於成分中含汞有傷害腦部之疑慮，目前美國本土已禁止硫柳汞添加於嬰幼兒之疫苗，但於動物用疫苗尚未禁止使用，若未來有更安全的取代品出現，將來可能會禁用。隨著科技的進步，疫苗製造水準之提升，目前已有部分動物用疫苗未添加任何防腐劑仍能維持應有的效力，因此未來不添加硫柳汞之疫苗應會愈來愈多。本報告參考日本之檢測方法[4]，需使用四氯化碳配製雙硫脲溶液，然四氯化碳為毒性

化學物質，一旦吸入或皮膚吸收現會出現中毒現象，傷害肝、腎、心、肺、皮膚，消化器官及神經系統等。高濃度的蒸氣暴露時會引起頭痛、疲勞，噁心嘔吐、頭暈、視力障礙等。於低濃度的蒸氣反覆暴露下，會引起慢性中毒，因此我國將四氯化碳列為管制藥品，目前國內四氯化碳並不易購買，因為利潤不高且為管制性藥品，故國內藥品代理廠商並不願意少量供貨。因此為確保實驗室人員安全及解決採購不易之問題，本實驗室已著手以 HPLC 測定疫苗中防腐劑含量的方法研發，期以更安全及精確之 HPLC 技術取代傳統化學檢測方法。

一般含濕度檢測方法中，以美國之方法 [9,10] 而言，檢測步驟相當繁複及耗時，每個樣品檢測需耗費 3 小時，而日本之方法[3]需使用具氣壓調整功能之真空乾燥測量儀，本實驗室雖無相同儀器，但採用較進步之微波水分測定儀，其樣品測定重量為 0.1 克至 0.3 克間，正好符合乾燥活毒之每瓶內容物重量，且每個樣品的測定時間為 5 分鐘以內，適用於本實驗室每月送檢之大量疫苗樣品，且於室內濕度 55% 以下時皆可達相當穩定的檢測結果，因此，此項技術於本實驗室已是相當穩定及成熟之檢驗技術。由本次含濕度檢測之統計結果顯示，國內廠之真空乾燥技術亦已相當成熟，同時可能是因為產品完成至送檢的時間相對較短，無需經空運、海關等層層關卡，故真空度較佳，含濕度亦穩定。不過，於本實驗室例行檢測經驗中，發現部分國產疫苗之玻璃瓶品質較差，於採集疫苗檢體過程中，瓶底易有破裂情形，此為國外產品未曾發生的情形，國內廠商應再加強玻璃瓶之品質。

吾國動物用疫苗之檢定係依據「動物用藥品檢驗標準」[1]，本標準中只訂定防腐劑含量及含濕度含量，並未詳細之實驗方法與步驟，除於民國 90 年曾建立「甲醛含量測定方法」及「含濕度測定方法」草案，但尚未公告實施，故仍無相關的國家檢驗標準操作程序。本實驗室參考美國、日本及歐洲等國之檢驗方法，比較並不斷改進傳統方法，未來期能建立適用於我國動物用生物藥品之檢驗標準操作程序，期能使國家檢定方法具一致的標準，以昭公信。

致謝 感謝台灣大學獸醫系王金和教授對本篇報告統計方法之建議及指導。

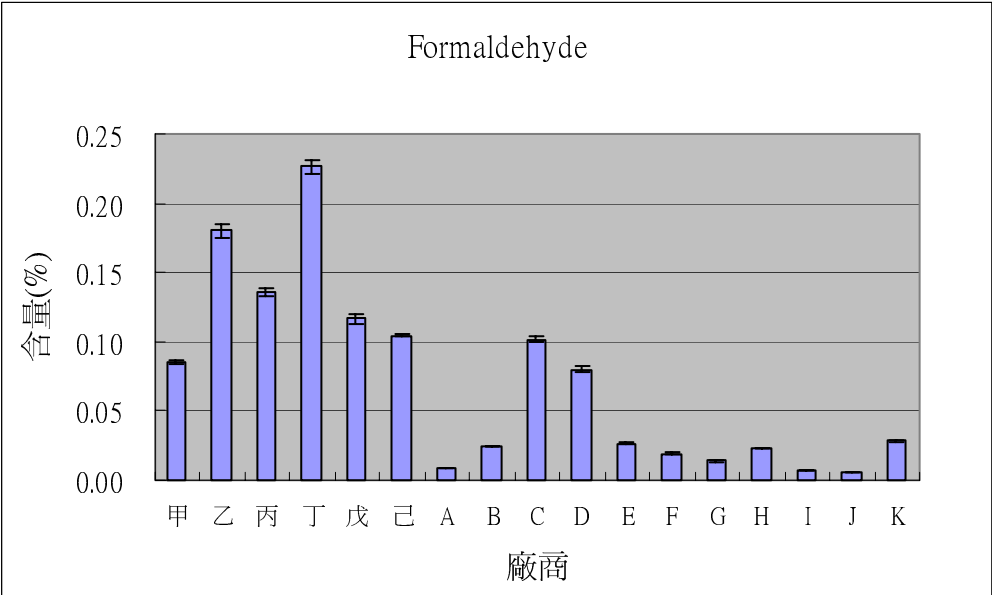


圖 1 禽用不活化疫苗各廠牌甲醛含量比較圖。
說明：柱狀圖為甲醛含量平均值，誤差線為變異數。

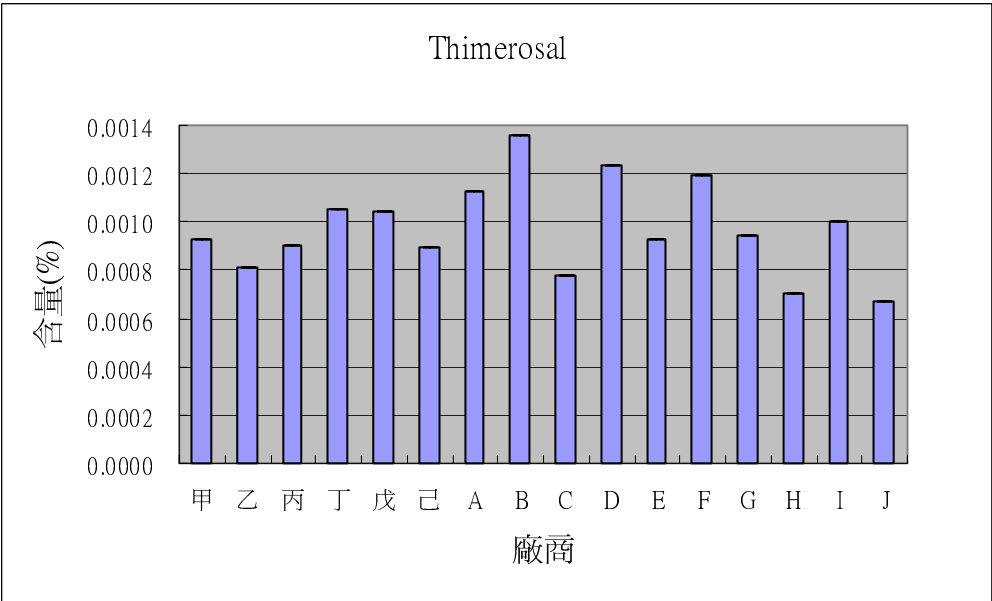


圖 2 禽用不活化疫苗各廠牌硫柳汞含量比較圖。
說明：柱狀圖為硫柳汞含量平均值。

禽用疫苗防腐劑含量及含濕度測定報告

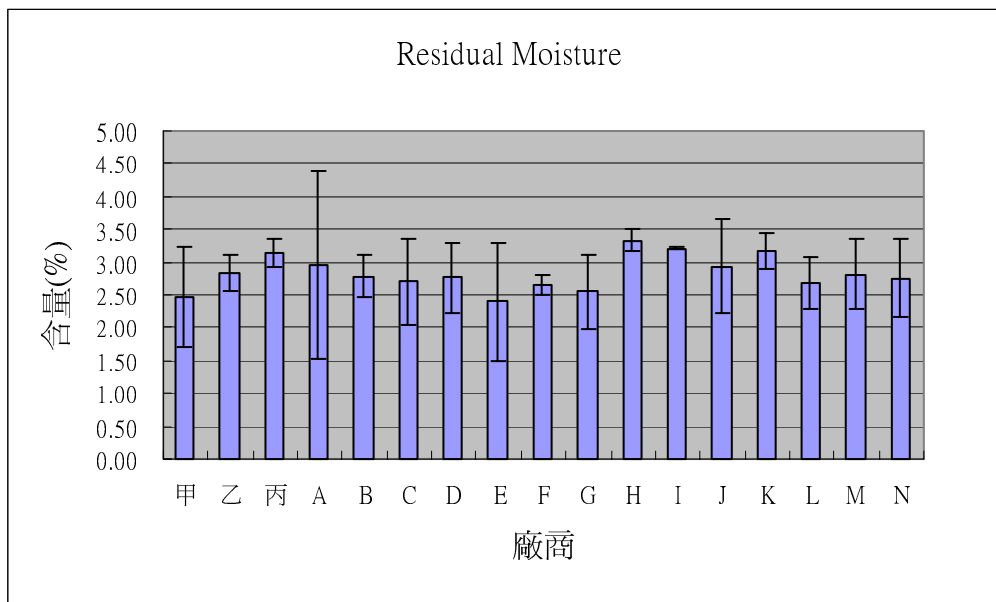


圖 3 禽用活毒疫苗各廠牌含濕度含量比較圖。

說明：柱狀圖為含濕度含量平均值，誤差線為變異數。

表一 禽用不活化疫苗各廠牌甲醛含量比較表

組別	個數	平均值	變異數
甲	20	0.0858	1.37E-03
乙	13	0.1804	4.96E-03
丙	26	0.1360	3.41E-03
丁	9	0.2262	5.07E-03
戊	18	0.1164	3.22E-03
己	10	0.1043	8.62E-04
A	7	0.0084	2.57E-05
B	10	0.0246	5.04E-04
C	12	0.1018	1.57E-03
D	3	0.0798	2.42E-03
E	21	0.0264	4.39E-04
F	6	0.0195	1.13E-04
G	15	0.0142	5.72E-04
H	4	0.0227	2.60E-04
I	11	0.0072	7.17E-05
J	38	0.0058	3.84E-05
K	4	0.0286	3.87E-04

說明：以 ANOVA 檢定各組間之 $P < 0.01$ ($P = 8.92 \times 10^{-53}$)，各組間具有顯著性差異。

表二 禽用不活化疫苗各廠牌硫柳汞含量比較表

組別	個數	平均值	變異數
甲	16	0.0009	1.52E-07
乙	6	0.0008	1.65E-08
丙	28	0.0009	1.67E-07
丁	6	0.0011	2.15E-07
戊	12	0.0010	2.32E-07
己	6	0.0009	1.89E-07
A	5	0.0011	9.42E-08
B	11	0.0014	2.37E-07
C	10	0.0008	3.47E-08
D	3	0.0012	7.39E-07
E	11	0.0009	7.01E-08
F	12	0.0012	2.92E-07
G	3	0.0009	3.91E-08
H	7	0.0007	9.76E-08
I	28	0.0010	2.84E-07
J	4	0.0007	9.11E-09

說明：以 ANOVA 檢定各組間之 $P > 0.05$ ($P = 0.0951$)，各組間無顯著性差異。

表三 禽用活毒疫苗各廠牌含濕度含量比較表

組別	個數	平均值	變異數
甲	6	2.48	0.7605
乙	7	2.83	0.2698
丙	3	3.14	0.2224
A	10	2.95	1.4326
B	15	2.79	0.3094
C	13	2.71	0.6583
D	20	2.76	0.5391
E	3	2.39	0.9014
F	5	2.65	0.1514
G	25	2.55	0.5739
H	7	3.33	0.1660
I	3	3.21	0.0184
J	18	2.93	0.7189
K	4	3.17	0.2806
L	20	2.67	0.3971
M	23	2.81	0.5325
N	18	2.75	0.5924

說明：以 ANOVA 檢定各組間之 $P > 0.05$ ($P = 0.6696$)，各組間無顯著性差異。

參考文獻

1. 行政院農業委員會。動物用藥品檢驗標準，中華民國八十七年。
2. 楊志良。生物統計學新論。藝軒圖書出版社。中華民國九十四年。
3. 含濕度試驗法。財團法人動物用生物學的製劑協會（日本），動物用生物學的製劑基準。P627，2002。
4. 硫柳汞定量法。財團法人動物用生物學的製劑協會（日本），動物用生物學的製劑基準。P642，2002。
5. 福馬林定量法。財團法人動物用生物學的製劑協會（日本），動物用生物學的製劑基準。P644，2002。
6. Center for veterinary biologics and national veterinary services laboratories testing protocol. Supplemental assay method for the manual determination of formaldehyde in veterinary biologics (Schiff test) . In <http://www.aphis.usda.gov/vs/cvb/sams/series/500/510.pdf>
7. Center for veterinary biologics testing protocol. Supplemental assay method for the determination of formaldehyde in veterinary biologics (Ferric chloride test) . In <http://www.aphis.usda.gov/vs/cvb/sams/series/500/512.pdf>
8. International cooperation on harmonisation of technical requirements for registration of veterinary medicinal products. Testing of residual formaldehyde, VICH GL25, 2000. In <http://www.inspection.gc.ca/english/animal/vetbio/vich/vichgl25e.shtml>
9. International cooperation on harmonisation of technical requirements for registration of veterinary medicinal products. Testing of residual moisture, VICH GL26, 2000. In <http://www.inspection.gc.ca/english/animal/vetbio/vich/vichgl26e.shtml>
10. United States department of agriculture center for veterinary biologics testing protocol. Supplemental assay method for the determination of residual moisture in veterinary biologics products. In <http://www.aphis.usda.gov/vs/cvb/sams/series/500/510.pdf>

Preservatives Content and Residual Moisture Contents of Poultry Vaccines

Yeh SR *, Chang CC, Hsu TL, Chao HJ, Chiu WH, Wu CC, Kwang MJ

Animal Drugs Inspection Branch, Animal Health Research Institute
Council of Agriculture, Executive Yuan

Abstract For understanding of preservatives, formaldehyde and thimersol, in the inactivated vaccines or residual moisture in the live vaccines, totally 427 samples for statutory assay of poultry vaccines sold in Taiwan, including the imported and the domestic, were examined during April 2005 and March 2006. Poultry vaccine samples were consisted of monovalent or multivalent vaccines against Newcastle disease, infectious bronchitis, infectious bursal disease, infectious coryza or egg drop syndrome. Significance difference of results among manufacturers or between the imported and the domestic were tested by analysis of variance. In terms of preservatives used in inactivated vaccines, the results of the amount of formaldehyde in 227 samples from 17 manufacturers showed significant difference by manufacturer ($p < 0.01$). In addition, up to 83.33% of domestic inactivated vaccines and only 9.09% of the imported were tested containing formaldehyde in amount over 0.1%. This indicated that formaldehyde was commonly used as the preservative by domestic vaccine manufacturers. As regards the thimersol, 168 samples from 16 manufacturers were examined and the results showed that no significant difference among manufacturers or between the import and the domestic ($p > 0.05$). In regard to the results of residual moisture in live vaccines, 200 samples from 17 manufacturers were measured and no significant difference among manufacturers ($p > 0.05$) was found as well.

Key words: Vaccine, Formaldehyde, Thimerosal, Residual moisture

*Corresponding Author
Animal Health Research Institute