

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710149563.7

[51] Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 21/25 (2006.01)

[43] 公开日 2008年2月13日

[11] 公开号 CN 101122602A

[22] 申请日 2007.9.6

[21] 申请号 200710149563.7

[71] 申请人 中国药品生物制品检定所

地址 100050 北京市崇文区天坛西里2号

[72] 发明人 胡昌勤 许明哲 王晨 崔生辉  
于风平

[74] 专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限公司

代理人 唐铁军 李维英

权利要求书3页 说明书11页

[54] 发明名称

一种中药注射制剂的质量检验和控制方法及试剂盒

[57] 摘要

本发明提供一种中药注射制剂的质量检验方法,该方法使用基于抗原-抗体反应原理建立的免疫分析技术对注射制剂中的低浓度植物蛋白和/或多肽类物质进行检测。所述方法包括以下步骤:(1)制备标准抗原;(2)制备标准抗体;(3)使用上述标准抗体,通过基于抗原-抗体反应原理建立的免疫分析技术检测待测样品中相应的残留植物蛋白和/或多肽类物质;(4)如果需要,可重复步骤(1)、(2)及(3),依次检测该制剂中用于制备该制剂的其它原料中药材的残留植物蛋白和/或多肽类物质。本发明的检测方法不但可以进行定性检测,还可以进行定量检测。本发明还提供用于该方法的酶联免疫吸附试剂盒和乳胶凝集试剂盒,以及一种中药注射制剂的质量控制方法。

1. 一种中药注射制剂的质量检验或控制方法，包括使用基于抗原-抗体反应原理建立的免疫分析技术对待测注射制剂中的植物蛋白和/或多肽类物质进行检测。

2. 权利要求 1 所述的方法，包括以下步骤：

(1) 制备标准抗原：选择制备该中药制剂的原料中药材中的一种，依照生产待测中药注射制剂的工艺条件，从该原料中药材中提取和纯化其中的植物蛋白和/或多肽类物质，作为标准抗原；

(2) 制备标准抗体：使用标准抗原对动物进行免疫处理，并从免疫后的动物血清中提取抗体作为标准抗体；

(3) 使用上述标准抗体，通过基于抗原-抗体反应原理建立的免疫分析技术检测待测样品中相应的残留植物蛋白和/或多肽类物质；

(4) 如果需要，可重复步骤(1)、(2)及(3)，依次检测该制剂中用于制备该制剂的其它原料中药材的残留植物蛋白和/或多肽类物质。

3. 权利要求 2 所述的方法，其中所述免疫分析技术为酶联免疫吸附法、乳胶凝集法、放射免疫法或荧光免疫法。

4. 权利要求 3 所述的方法，其中酶联免疫吸附法包括以下步骤：

在固相载体表面分别使用待测注射制剂以及阳性和阴性对照液进行包被，并使用封闭液进行封闭；

使用所述标准抗体处理经过上述封闭的固相载体；

使用酶标抗体处理经过上述标准抗体处理的固相载体；

再将由此获得的固相载体与底物缓冲液接触；

当与包被有阳性对照物的固相载体接触的底物缓冲液出现明显颜色变化时，向与各固相载体接触的底物缓冲液中分别加入终止液以终止反应；

对所得各反应溶液的吸光度进行检测，如果待测样品的反应溶液的吸光度小于或等于阴性对照物的反应溶液的吸光度，认定待测注射制剂质量合格，如果其吸光度大于阴性对照物的反应溶液的吸光度，认定待测注射制剂质量不合格。

5. 权利要求 4 所述的方法，其特征在于所述阳性对照液为浓度  $> 0.25 \mu\text{g/ml}$  的标准抗原溶液。

6. 权利要求 4 所述的方法，其特征在于使用待测注射制剂进行包被

前，先用稀释液将待测注射制剂稀释至抗原浓度为  $1\mu\text{g/ml}$  至  $200\mu\text{g/ml}$ 。

7. 权利要求 6 所述的方法，其特征在于使用待测注射制剂进行包被时，用稀释液将待测注射制剂稀释至抗原浓度为  $2\mu\text{g/ml}$  至  $150\mu\text{g/ml}$ 。

8. 权利要求 6 或 7 所述的方法，其特征在于稀释后的待测注射制剂的 pH 值为 8 至 10。

9. 权利要求 6 或 7 所述的方法，其特征在于所述稀释液为 pH 值为 9.6 的碳酸盐缓冲液或 pH 值为 7.2 的磷酸盐缓冲液。

10. 权利要求 4 所述的方法，其特征在于使用标准抗体处理所述经过封闭的固相载体前，先用稀释液将标准抗体的浓度稀释至  $0.01\text{mg/ml}$  至  $0.1\text{mg/ml}$ 。

11. 权利要求 10 所述的方法，其特征在于用稀释液将标准抗体的浓度稀释至  $0.01\text{mg/ml}$  至  $0.05\text{mg/ml}$ 。

12. 权利要求 4 所述的方法，其特征在于所述酶标抗体为辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG。

13. 权利要求 4 或 12 所述的方法，其特征在于所述酶标抗体可在使用前被稀释至浓度为  $0.1\mu\text{g/ml}$  至  $100\mu\text{g/ml}$ 。

14. 权利要求 3 所述的方法，其中所述免疫分析技术为乳胶凝集法，包括以下步骤：

将所述标准抗体与乳胶颗粒进行共价偶联，形成乳胶偶联抗体；

将上述乳胶偶联抗体分别与待测注射制剂、阳性对照液和阴性对照液混合，并在  $25$  至  $40^\circ\text{C}$  下静置；

1-5 分钟内，在阳性对照物中出现肉眼可见的凝集颗粒，且阴性对照物中无凝集的条件下，如果待测样品中出现肉眼可见的凝集颗粒，则表明待测样品中含有植物蛋白和/或多肽类物质，即待测样品不合格，反之则为合格。

15. 权利要求 14 所述的方法，其特征在于所述阳性对照液为用稀释缓冲液溶解的浓度为  $10\mu\text{g/ml}$  至  $20\mu\text{g/ml}$  的所述标准抗原的溶液。

16. 权利要求 1 或 2 所述的方法，其特征在于所述注射制剂中含有丹参提取物或刺五加提取物。

17. 权利要求 3 或 4 所述的方法，所述方法中还包括利用一系列浓度已知的标准抗原溶液，绘制酶联免疫反应后的反应溶液的吸光度值与

标准抗原浓度之间关系的标准曲线，测得待测注射制剂在酶联免疫反应后的反应溶液的吸光度值后，在标准曲线中进行插值计算即可定量推知其中该标准抗原的浓度。

18. 用于对中药注射制剂中残留植物蛋白和/或多肽类物质进行检测的酶联免疫试剂盒，包括箱体、箱体内的酶标板、阳性对照液、阴性对照液、稀释液、洗涤液、封闭液、标准抗体、酶标抗体、底物缓冲液和终止液，其特征在于所述标准抗体按照以下方法制得：选择制备待测中药制剂的原料中药材中的一种，依照生产待测中药注射制剂的工艺条件，从该原料中药材中提取和纯化其中的植物蛋白和/或多肽类物质，作为标准抗原，然后使用标准抗原对动物进行免疫处理，并从免疫后的动物血清中提取抗体作为标准抗体；如果需要，可以按照上述步骤制取相应于该制剂中不同的原料中药材的标准抗体以供测试之用。

19. 权利要求 18 的酶联免疫吸附试剂盒，其特征在于盒中还包括用于制作标准曲线的参考标准品。

20. 用于对中药注射制剂中残留植物蛋白和/或多肽类物质进行检测的乳胶凝集试剂盒，包括箱体、阳性对照液、阴性对照液、乳胶偶联抗体、凝集板，其特征在于所述标准抗体按照以下方法制得：选择制备待测中药制剂的原料中药材中的一种，依照生产待测中药注射制剂的工艺条件，从该原料中药材中提取和纯化其中的植物蛋白和/或多肽类物质，作为标准抗原，然后使用标准抗原对动物进行免疫处理，并从免疫后的动物血清中提取抗体作为标准抗体；如果需要，可以按照上述步骤制取相应于该制剂中不同的原料中药材的标准抗体以供测试之用。

21. 权利要求 18 至 20 之一的试剂盒，其特征在于所述中药注射制剂为含有丹参提取物或刺五加提取物的中药注射制剂。

## 一种中药注射制剂的质量检验和控制方法及试剂盒

### 技术领域

本发明涉及对中药注射制剂进行质量检验的方法，具体而言，涉及使用基于抗原-抗体反应原理建立的免疫分析技术，如酶联免疫吸附法、乳胶凝集法等对中药注射制剂中残留的植物蛋白和/或多肽类物质进行检测的方法。本发明还涉及用于该检测目的的试剂盒，以及一种中药注射制剂的质量控制方法。

### 背景技术

大多数中药注射制剂通常按照以下方法制备：将中药材粉碎，加水煎煮或进行水蒸气蒸馏提取（水提），提取液用乙醇进行沉淀（醇沉），过滤，除去滤液中的乙醇，再经稀释等处理制成注射制剂。

作为对传统中药剂型的一种改进，中药注射制剂具有广阔的市场前景。但人们同时注意到，在使用中药注射制剂的过程中，经常会出现一些不良的临床反应，例如过敏反应。这些不良反应在某种程度上限制了中药注射制剂的使用。

在中药注射制剂引起的不良反应事件中，以香丹/丹参注射液引起的药物不良反应事件最为多见。另外，包括刺五加注射液在内的其它中药注射液亦时有不良临床反应报道。该问题虽经业内技术人员多方探究，但原因一直无法确定，并直接导致中药注射制剂的质量无法得到有效的控制和提高。

目前对中药注射制剂进行质量检验的方法中，例如专利 03104765.3 和 200410070103.1，多是通过红外光谱和色谱等方法对制剂中的有效成分进行检测。但临床结果表明，经这些质量检验方法被确定为合格产品的中药注射制剂依然会引起前述不良临床反应。

另外，中华人民共和国药典 2005 年版（一部）附录 IXS 注射剂有关物质检查法中提供了蛋白质检测方法：“除另有规定外，取注射液 1ml，加新配制的 30%磺基水杨酸溶液 1ml，混匀，放置 5 分钟，不得出

现混浊。注射液中如含有遇酸能产生沉淀的成分，可改加鞣酸试液 1-3 滴，不得出现混浊。”但是，使用该方法检验合格的中药注射制剂在临床应用时，同样经常会有上述不良反应出现。

因此，确定发生不良临床反应的原因，并寻找到有效的检测方法，对于中药注射制剂质量的控制和提高有着至关重要的意义。

## 发明内容

本发明人在对大量中药注射制剂进行多方研究后意外地发现，中药注射制剂中残留的低含量植物蛋白和/或多肽类物质（抗原）是造成临床不良反应，例如过敏反应的原因之一。

因此，本发明的目的之一是提供一种中药注射制剂的质量检验方法，该方法使用基于抗原-抗体反应原理建立的免疫分析技术，如酶联免疫吸附法、乳胶凝集法、放射免疫法和荧光免疫法等对注射制剂中的低浓度植物蛋白和/或多肽类物质进行检测。

本发明所述中药注射制剂质量检验方法包括以下步骤：

(1) 制备标准抗原：选择制备该中药制剂的原料中药材中的一种，依照生产待测中药注射制剂的工艺条件，从该原料中药材中提取和纯化其中的植物蛋白和/或多肽类物质，作为标准抗原；

(2) 制备标准抗体：使用标准抗原对动物如家兔等进行免疫处理，并从免疫后的动物血清中提取抗体作为标准抗体；

(3) 使用上述标准抗体，通过基于抗原-抗体反应原理建立的免疫分析技术检测待测样品中相应的残留植物蛋白和/或多肽类物质；

(4) 如果需要，可重复步骤(1)、(2)及(3)，依次检测该制剂中用于制备该制剂的其它原料中药材的残留植物蛋白和/或多肽类物质。

本发明的另一个目的在于提供用于上述检测的酶联免疫吸附试剂盒，该试剂盒包括：盒体、盒体内的酶标板、阳性对照液、阴性对照液、稀释液、洗涤液、封闭液、标准抗体、酶标抗体、底物缓冲液和终止液；

本发明的再一个目的在于提供用于上述检测的乳胶凝集试剂盒，该试剂盒包括：盒体、阳性对照液、阴性对照液、乳胶偶联抗体、稀释缓冲液、凝集板。

本发明的又一个目的在于提供一种中药注射制剂的质量控制方法，该方法通过监控注射制剂中残留的植物蛋白和/或多肽类物质的含量对

注射制剂的质量进行控制。

使用本发明方法检验结果为合格的同批次产品临床使用后上述不良临床反应明显降低。同时，使用本发明方法检验结果为不合格的中药注射制剂，按照药典中记载的蛋白质检测方法进行检测并未检测到蛋白质的存在。由此可知，本发明的方法灵敏度高于药典的已知检验方法。同时，本发明方法还具有准确度高，操作简单方便，检测成本低的优点，适合对市场上中药注射制剂进行普查式检测和中药注射制剂的质量控制。

### 具体实施方式

具体而言，本发明的中药注射制剂质量检验方法包括以下步骤：

(1) 制备标准抗原：选择制备该中药制剂的原料中药材中的一种，依照生产待测中药注射制剂的工艺条件，从该原料中药材中提取和纯化其中的植物蛋白和/或多肽类物质，作为标准抗原；

(2) 制备标准抗体：使用标准抗原对动物如家兔等进行免疫处理，并从免疫后的动物血清中提取抗体作为标准抗体；

(3) 使用上述标准抗体，通过基于抗原-抗体反应原理建立的免疫分析技术检测待测样品中相应的残留植物蛋白和/或多肽类物质；

(4) 如果需要，可重复步骤(1)、(2)及(3)，依次检测该制剂中用于制备该制剂的其它原料中药材的残留植物蛋白和/或多肽类物质。

其中，标准抗原的制备可采用以下方法：

将用于提取标准抗原的中药材加水回流后过滤，向滤液中加入乙醇并静置，过滤弃去滤渣后，向滤液中再次加入乙醇并再行静置、过滤，将滤出的沉淀作为标准抗原。其中第一次加入乙醇使乙醇的体积百分比达到50%至80%，第二次加入乙醇使乙醇的体积百分比达到70%至90%，优选将所制得的沉淀重新溶于水后冻干。

此外，也可依照生产待测中药注射制剂的工艺条件，采用其他方法，如超滤等方法提取标准抗原。

对动物进行免疫处理以产生标准抗体可采用例如以下方法：

首先对动物注射标准抗原溶液与弗氏完全佐剂的等体积乳状混合物；一段时间后再对动物注射标准抗原溶液与弗氏不完全佐剂的等体积乳状混合物。其中所述标准抗原溶液的浓度可为0.2mg/ml至5mg/ml，

每次注射的乳状混合物剂量可为 0.2ml 至 1.0ml，所述一段时间可为例如 7 至 24 天。

也可采用本领域技术人员已知的其他方法进行免疫处理。

从免疫后的动物血清中提取、纯化标准抗体可采用例如在动物血清中加入硫酸铵溶液进行沉淀、然后再从沉淀中去除硫酸铵的方法。其中加入硫酸铵溶液后应使硫酸铵的饱和度达到 40%至 60%，硫酸铵的去除可通过例如透析、凝胶过滤等方法进行，任选在将标准抗体沉淀出来之前先用较低浓度的硫酸铵溶液在血清中进行预沉淀，或者在将标准抗体沉淀出来之后对标准抗体进行进一步纯化。

此外，也可采用本领域技术人员已知的其他方法从动物血清中提取标准抗体。

基于抗原-抗体反应原理建立的免疫分析技术包括酶联免疫吸附法、乳胶凝集法以及本领域技术人员已知的基于抗原-抗体反应原理建立的其他免疫分析技术。

其中，酶联免疫吸附法可包括以下步骤：

首先，在固相载体表面分别使用待测注射制剂以及阳性和阴性对照液进行包被，并使用封闭液进行封闭；

其次，使用所述标准抗体处理经过上述封闭的固相载体；

再次，使用酶标抗体处理经过上述标准抗体处理的固相载体；

然后将由此获得的固相载体与底物缓冲液接触；

当与包被有阳性对照物的固相载体接触的底物缓冲液出现明显颜色变化时，向与各固相载体接触的底物缓冲液中分别加入终止液以终止反应；

对所得各反应溶液的吸光度进行检测，如果待测样品的反应溶液的吸光度小于或等于阴性对照物的反应溶液的吸光度，认定待测注射制剂质量合格；如果其吸光度大于阴性对照物的反应溶液的吸光度，认定待测注射制剂质量不合格。

使用待测注射制剂对固相载体表面进行包被时，可首先使用稀释液将待测注射制剂稀释，再使稀释后的待测注射制剂与固相载体相接触，然后洗去未被固相载体吸附的物质。其中所述固相载体可为微量滴定板、小珠或小试管或本领域中常用的其他固相载体。所述稀释液可为 pH 值为 9.6 的碳酸盐缓冲液、pH 值为 7.2 的磷酸盐缓冲液或本领域已

知的其他稀释液。待测注射制剂可被稀释至抗原浓度为  $1\ \mu\text{g}/\text{ml}$  至  $200\ \mu\text{g}/\text{ml}$ ，优选为  $2\ \mu\text{g}/\text{ml}$  至  $150\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 。抗原溶液和抗体溶液的浓度采用以下经验公式计算：

$$C(\text{mg}/\text{ml}) = OD_{280\text{nm}} \times 1.45 - OD_{260\text{nm}} \times 0.74$$

其中，C 为抗原或抗体浓度， $OD_{280\text{nm}}$  及  $OD_{260\text{nm}}$  分别表示所述溶液在波长 280nm 处和 260nm 处的吸光度。

稀释后的溶液的 pH 值优选为 8 至 10。本文中“接触”的含义为：当固相载体为微量滴定板或小试管时，将液体加入微量滴定板的板孔中或小试管中以实现接触；当固相载体为小珠时，将小珠悬浮在液体中以实现接触。此处所述接触的持续时间应为 15 至 20 小时。

上述酶联免疫吸附法的各步骤中所述洗涤均可采用例如含有 0.05% 吐温 80 的 pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液作为洗涤液，也可为本领域中习知的其他洗涤液，洗涤优选重复数次。

封闭液可为含有 0.05-0.5% 的牛血清白蛋白的 pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液，或含有 5% 脱脂奶粉的 pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液，或本领域中使用的其他已知封闭液。封闭的方法是将经过上述包被的固相载体与封闭液接触，然后对固相载体进行洗涤。此处所述接触的持续时间应为 1 至 3 小时。

阴性对照液可为稀释液，或者封闭液。阳性对照液可为浓度  $\geq 0.25\ \mu\text{g}/\text{ml}$  的标准抗原溶液。

可通过将标准抗体用稀释液稀释至所需浓度、再将所得溶液与经过上述封闭的固相载体相接触、然后洗去未被吸附的物质，来实现所述使用标准抗体对经过上述封闭的固相载体的处理。可供使用的稀释液如上所述。

标准抗体可被稀释至浓度为  $0.01\ \text{mg}/\text{ml}$  至  $0.1\ \text{mg}/\text{ml}$ ，优选为  $0.01\ \text{mg}/\text{ml}$  至  $0.05\ \text{mg}/\text{ml}$ 。此处所述接触的持续时间优选为 1 至 3 小时。

可通过用稀释液稀释酶标抗体、再将稀释后的酶标抗体溶液与经过上述标准抗体处理的固相载体相接触、然后洗去未被吸附的物质的方式，来实现所述使用酶标抗体对经过上述标准抗体处理的固相载体的处理。其中所述酶标抗体可为市售的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 或其他合适的酶标抗体。可供使用的稀释液定义如上所述。

稀释后的酶标抗体的浓度取决于酶标抗体的效价，具体浓度可由本

领域技术人员用常规方法通过预备实验来确定，该浓度通常在  $0.1 \mu\text{g/ml}$  至  $100 \mu\text{g/ml}$  的范围内。此处所述接触的持续时间优选为 1 至 3 小时。

底物缓冲液可以是可被所述酶标抗体中的酶催化而进行反应的任何本领域已知底物缓冲液。

终止液可为浓度为 2% 的硫酸，或本领域中已知的其他终止液。

除包被过程应在  $0$  至  $4^\circ\text{C}$  下进行之外，上述酶联免疫吸附法的其他步骤均可在  $25$  至  $40^\circ\text{C}$  下进行。

此外，还可使用其他的酶联免疫吸附法进行检测。

当所述基于抗原-抗体反应原理建立的免疫分析技术为酶联免疫吸附法时，还可用于进行定量检测。具体而言，是利用一系列浓度已知的标准抗原溶液，绘制酶联免疫反应后的反应溶液的吸光度值与标准抗原浓度之间关系的标准曲线，测得待测注射制剂的吸光度值后，在标准曲线中进行插值计算即可定量推知其中该抗原的浓度。

所述基于抗原-抗体反应原理建立的免疫分析技术还可为乳胶凝集法，包括以下步骤：

将所述标准抗体与乳胶颗粒进行共价偶联，形成乳胶偶联抗体；

将上述乳胶偶联抗体分别与待测注射制剂、阳性对照液和阴性对照液混合后在  $25$  至  $40^\circ\text{C}$  下静置；

1-5 分钟内，在阳性对照物中出现肉眼可见的凝集颗粒，且阴性对照物中无凝集的条件下，如果待测样品中出现肉眼可见的凝集颗粒，则表明待测样品中含有植物蛋白和/或多肽类物质，即待测样品不合格，反之则为合格。

其中乳胶颗粒可为市售的用于乳胶凝集法的乳胶颗粒，或由其他途径获得的乳胶颗粒，其直径为  $0.3 \mu\text{m}$  至  $0.8 \mu\text{m}$ 。

将标准抗体与乳胶颗粒共价偶联可通过例如以下方法进行：

将乳胶颗粒与含有碳二亚胺 (EDAC) 和标准抗体的 2-(*N*-吗啡啉)乙磺酸 (MES) 缓冲液混合，制成乳胶颗粒悬浮液，室温下静置 10-60 分钟；

以  $3000\text{g}$  的离心力离心 5-30 分钟，然后弃去上清液；

将沉淀重新悬浮于与离心分离之前的乳胶颗粒悬浮液等体积的 MES 缓冲液中。

其中 MES 与 EDAC 的浓度均在 0.15-2.6mM 范围内,标准抗体的浓度为 0 mg/ml<标准抗体浓度 ≤ 2mg/ml, MES 缓冲液的 pH 值为 6.1,离心分离之前的乳胶颗粒悬浮液中乳胶颗粒的质量百分比浓度在 0.5-2%的范围内。

也可以使用本领域中用于将乳胶颗粒与抗体共价偶联的其他方法。待测注射制剂可用稀释缓冲液稀释,通常稀释 0 至 11 倍。

乳胶偶联抗体悬浮液的用量应为稀释后的注射制剂体积的 2-5 倍。

阳性对照液为用稀释缓冲液溶解的浓度为 10 μg/ml 至 20 μg/ml 的所述标准抗原的溶液,阴性对照液可为稀释缓冲液、盐水或不含所述标准抗原的其它水溶液。

稀释缓冲液可为例如 pH 值为 7.2 的 PBS,或 MES 缓冲液,或本领域已知的其他稀释液。

本发明的酶联免疫试剂盒包括:盒体、盒体内的酶标板、阳性对照液、阴性对照液、稀释液、洗涤液、封闭液、标准抗体、酶标抗体、底物缓冲液和终止液。此外,盒中还可以包括一系列浓度已知的标准抗原的溶液作为参考标准品用于定量检测。

本发明的乳胶凝集试剂盒包括:盒体、阳性对照液、阴性对照液、稀释缓冲液、乳胶偶联抗体、凝集板。

本发明所称中药注射制剂是指,含有中药材提取物的各种注射制剂。

下面结合具体实施例对本发明进一步说明,但本发明不限于这些具体的实施例。

### 实施例 1 酶联免疫吸附法检测含丹参提取物的注射液

#### 1. 标准抗原与标准抗体的制备与纯化

取丹参 10 克,轻微破碎后加水 80ml,回流 2 小时后过滤,将滤液浓缩至 40ml,加入乙醇至乙醇的体积百分比达到 75%,静置 20 小时后过滤,弃滤渣,滤液浓缩至 33ml,再次加入乙醇至乙醇的体积百分比达到 85%,静置 20 小时后过滤,将所得滤渣加水溶解后冻干,制得丹参标准抗原。

使用所得丹参标准抗原对家兔进行免疫处理。家兔在进行免疫之前先饲养一周,然后分别于第 0 天,第 7 天以 1.0ml 的剂量皮下多点注射

浓度为 0.5mg/ml 的上述丹参标准抗原的溶液与弗氏完全佐剂的等体积乳状混合物；第 21 天以 1.0ml 的剂量注射浓度为 0.5mg/ml 的上述丹参标准抗原的溶液与弗氏不完全佐剂的等体积乳状混合物。

取免疫处理后家兔的血清 2.0ml，向其中加入饱和硫酸铵溶液，使血清溶液中硫酸铵的饱和度达到 20%，于 4℃ 静置 2 小时，再于 4℃ 以 5000g 的离心力离心 30 分钟，沉淀弃置不用。向所得上清液中再加入饱和的硫酸铵溶液，使溶液中硫酸铵的饱和度达到 50%，重复上述沉淀分离步骤。弃去上清液，将所得沉淀溶于 2.0ml 稀释液（PBS，pH7.4）后装入透析袋中，再置于 100 倍的上述样本稀释液中并于 4℃ 透析 24 小时，制得标准抗体，其间更换 4 次透析液。

## 2. 注射液中残留植物蛋白和/或多肽类物质的检测

对 308 批丹参注射液、丹香冠心注射液、香丹注射液样品按以下步骤进行检测：

（1）包被抗原：将 1ml 待测注射液用 10ml pH 值为 9.6 的碳酸盐缓冲液稀释，在微量滴定板的每孔中加入 100 μl 该稀释后的待测注射液，然后在 4℃ 的冰箱中放置 16-18 小时；另外用同样方法包被阳性和阴性对照液，其中阳性对照液是使用 pH 值为 9.6 的碳酸盐缓冲液溶解的浓度为 0.25 μg/ml 的丹参标准抗原溶液，阴性对照液为 pH 值为 9.6 的碳酸盐缓冲液；

（2）洗涤：倾尽板孔中的液体，加入 pH 值为 7.4，含有 0.05% 吐温 80 的磷酸盐缓冲液 200 μl，静置 3 分钟，振荡 1 分钟，反复 3 次，最后将反应板倒置在吸水纸上，使孔中液体流尽；

（3）封闭：每孔中加入 pH 值为 7.4，含有 5% 脱脂奶的磷酸盐溶液 200 μl，37℃ 下放置 1 小时；

（4）重复洗涤步骤（2）；

（5）加标准抗体：用 pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液将制得的标准抗体稀释至浓度为 20 μg/ml，向每孔中加入 100 μl，37℃ 下放置 1.5 小时；

（6）重复洗涤步骤（2）；

（7）加酶标抗体：用 pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液将来自 Santa Cruz Biotechnology 的浓度为 400 μg/ml 的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔

IgG 按 1:1000 的比例稀释, 每孔中加 100  $\mu$ l, 37 $^{\circ}$ C 下放置 1 小时;

(8) 重复洗涤步骤 (2);

(9) 每孔中加入 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 尿素-TMB 底物缓冲液 100  $\mu$ l, 37 $^{\circ}$ C 下在暗处放置约 15 分钟。其中, 所使用的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 尿素-TMB 底物缓冲液按下述方法制备: 首先将含有 0.1mol/ml 柠檬酸和 0.2mol/ml Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 的溶液 993.6ml 与 0.75% 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 尿素溶液 6.4ml 混合并调节 pH 值至 5.2, 获得溶液 A, 再将 200mg TMB 用 100 ml 无水乙醇溶解, 加水稀释至 1000 ml, 获得溶液 B, 将溶液 A 与溶液 B 以 1:1 的体积比混合, 即得到 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 尿素-TMB 底物缓冲液;

(10) 加终止液: 当阳性对照物的底物缓冲液出现明显颜色变化时, 向每孔中加入浓度为 2% 的硫酸溶液 50  $\mu$ l;

结果显示, 其中有 38 批样品的相应吸光度大于阴性对照物的吸光度, 质量不合格; 其它样品的相应吸光度小于阴性对照物的吸光度, 质量合格。

### 3. 线性范围的确定

取纯化的丹参标准抗原用稀释液配制成以下系列浓度的溶液: 128、64、32、16、8、4、2、1、0.5、0.25  $\mu$ g/ml, 各取 100  $\mu$ l 包被在 96 孔酶标板上, 按上述 2 中的步骤进行操作。以吸光度值为横坐标, 以抗原浓度对数值为纵坐标作线性回归, 得线性范围为 2  $\mu$ g/ml-128  $\mu$ g/ml, 最低检出浓度为 0.25  $\mu$ g/ml。

## 实施例 2 酶联免疫吸附法检测刺五加注射液

### 1. 标准抗原和标准抗体的制备与纯化

取刺五加标准药材粉碎, 从中取粉末 58 克, 第一次加水 100ml 煎煮回流 2 小时, 过滤分离煎液和滤渣, 向滤渣中第二次加水 80ml 煎煮回流 1.5 小时, 再次过滤分离煎液和滤渣。合并两次煎液, 过滤。将所得滤液浓缩至 90ml, 加乙醇至乙醇体积百分比为 70%, 静置 48 小时后过滤, 向滤液中加入乙醇至乙醇体积为 86%, 静置 48 小时后过滤, 滤渣加水溶解后冻干, 制得刺五加标准抗原。

选择雄性新西兰大白兔, 将其在免疫之前先饲养一周。第 0 天于后肢淋巴结处以 1.0ml 的剂量注射浓度为 2.5mg/ml 的上述标准抗原的溶

液与弗氏完全佐剂的等体积乳状混合物；第14天以1.0ml的剂量皮下多点注射浓度为2.5mg/ml的上述标准抗原的溶液与弗氏完全佐剂的等体积乳状混合物；第24天以1.0ml的剂量皮下多点注射浓度为2.5mg/ml的上述标准抗原的溶液与弗氏不完全佐剂的等体积乳状混合物。第34天在耳缘静脉以1.0ml的剂量注射上述标准抗原的溶液。一周内采用凝胶双向扩散法试血，抗体效价大于等于1:16即认为合格，进行颈动脉采血。

取兔血在室温下放置过夜，离心取血清2.0ml，向其中加入饱和硫酸铵溶液，使血清溶液中硫酸铵的饱和度达到50%，于4℃静置2小时，再于4℃以12000g的离心力离心30分钟，取沉淀加2.0ml水溶解，加入饱和的硫酸铵溶液，使硫酸铵的饱和度达到50%，于4℃静置2小时，在4℃下以12000g的离心力离心30分钟，弃上清液，将沉淀溶于2.0ml样本稀释液（PBS，pH7.4）后装入透析袋中，再置于100倍的上述样本稀释液中并于4℃下透析24小时，其间更换4次透析液。

## 2. 注射液中残留植物蛋白和/或多肽类物质的检测

对98批刺五加注射液按以下步骤进行检测：

（1）包被抗原：将1ml待测注射液用10ml pH值为9.6的碳酸盐缓冲液稀释，在微量滴定板的每孔中加入100μl该稀释后的待测注射液，在4℃的冰箱中放置16~18小时。另外用同样方法包被阳性和阴性对照液，其中阳性对照液为用pH值为9.6的碳酸盐缓冲液溶解的浓度为0.5μg/ml的刺五加标准抗原溶液，阴性对照液为pH值为9.6的碳酸盐缓冲液。

（2）洗涤：倾尽板孔中的液体，加入pH值为7.4的含有0.05%吐温80的磷酸盐缓冲液200μl，静置3分钟，振荡1分钟，反复3次，最后将反应板倒置在吸水纸上，使孔中液体流尽。

（3）封闭：每孔中加入含有5%脱脂奶粉的pH值为7.4的磷酸盐溶液200μl，37℃下放置1小时。

（4）重复洗涤步骤（2）。

（5）加标准抗体：用pH7.4的磷酸盐缓冲液将所制标准抗体稀释至浓度为30μg/ml向每孔中加入100μl，37℃下放置1.5小时。

（6）重复洗涤步骤（2）。

(7)加酶标抗体:用 pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液将来自 Santa Cruz Biotechnology 的浓度为  $400\ \mu\text{g}/\text{ml}$  的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 按 1: 1000 的比例稀释, 每孔中加  $100\ \mu\text{l}$ ,  $37^\circ\text{C}$  下放置 1 小时。

(8) 重复洗涤步骤 (2)。

(9) 加底物缓冲液: 每孔中加  $\text{H}_2\text{O}_2$  尿素-TMB 底物缓冲液  $100\ \mu\text{l}$ ,  $37^\circ\text{C}$  下放置约 15 分钟, 其中所使用的  $\text{H}_2\text{O}_2$  尿素-TMB 底物缓冲液与实施例 1 中相同。

(10)加终止液:当阳性对照物的底物缓冲液出现明显颜色变化时, 向每孔中加入浓度为 2% 的硫酸  $50\ \mu\text{l}$ 。

(11)观察结果:用酶标仪记录 450nm 的吸光度读数并与阴性对照物进行比较。

结果显示, 11 批样品的吸光度大于阴性对照物的吸光度, 表明这些样品中含有植物蛋白和/或多肽类物质。

### 实施例 3 乳胶凝集法检测丹参注射液

#### 1. 乳胶偶联抗体的制备

将 1ml 含有 0.15mM EDAC (Sigma Prod. No. E-7750)、0.15mM MES (Sigma Prod. No. M-8250) 和 1 mg/ml 标准抗体的缓冲液 (pH 6.1) 与乳胶颗粒混合, 其中乳胶颗粒直径为  $0.8\ \mu\text{m}$ , 所得混合物中乳胶颗粒的质量百分比浓度为 1%;

室温下静置 30 分钟;

以 3000g 的离心力离心 10 分钟, 弃去上清液;

将沉淀重新悬浮于 1ml MES 缓冲液中。

#### 2. 乳胶凝集试验

将  $50\ \mu\text{l}$  上述乳胶偶联抗体的悬浮液分别与  $10\ \mu\text{l}$  丹参注射液(经酶联免疫吸附法检测, 其中含有抗原)、 $10\ \mu\text{l}$  阴性对照液和  $10\ \mu\text{l}$  阳性对照液在无菌玻片上混合, 其中阴性对照液为 PBS (pH=7.2), 阳性对照液为浓度为 2mg/ml 的标准抗原的 PBS (pH=7.2) 溶液。

室温下静置 3 分钟。

阳性对照物和被测丹参注射液中出现明显的凝集颗粒, 阴性对照物中没有出现凝集现象。

专利名称(译)	一种中药注射制剂的质量检验和控制方法及试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN101122602A</a>	公开(公告)日	2008-02-13
申请号	CN200710149563.7	申请日	2007-09-06
[标]申请(专利权)人(译)	中国药品生物制品检定所		
申请(专利权)人(译)	中国药品生物制品检定所		
当前申请(专利权)人(译)	中国药品生物制品检定所		
[标]发明人	胡昌勤 许明哲 王晨 崔生辉 于风平		
发明人	胡昌勤 许明哲 王晨 崔生辉 于风平		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N21/25		
代理人(译)	唐铁军		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明提供一种中药注射制剂的质量检验方法，该方法使用基于抗原 - 抗体反应原理建立的免疫分析技术对注射制剂中的低浓度植物蛋白和/或多肽类物质进行检测。所述方法包括以下步骤：(1)制备标准抗原；(2)制备标准抗体；(3)使用上述标准抗体，通过基于抗原 - 抗体反应原理建立的免疫分析技术检测待测样品中相应的残留植物蛋白和/或多肽类物质；(4)如果需要，可重复步骤(1)、(2)及(3)，依次检测该制剂中用于制备该制剂的其它原料中药材的残留植物蛋白和/或多肽类物质。本发明的检测方法不但可以进行定性检测，还可以进行定量检测。本发明还提供用于该方法的酶联免疫吸附试剂盒和乳胶凝集试剂盒，以及一种中药注射制剂的质量控制方法。