



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105301231 A

(43) 申请公布日 2016. 02. 03

(21) 申请号 201510651353. 2

(22) 申请日 2015. 10. 10

(71) 申请人 南京中医药大学

地址 210046 江苏省南京市栖霞区仙林大道
138 号

(72) 发明人 程建明 朱丹凤 林瑛 帅维维
柴尧 彭九嫚

(74) 专利代理机构 南京经纬专利商标代理有限
公司 32200

代理人 唐循文

(51) Int. Cl.

G01N 33/535(2006. 01)

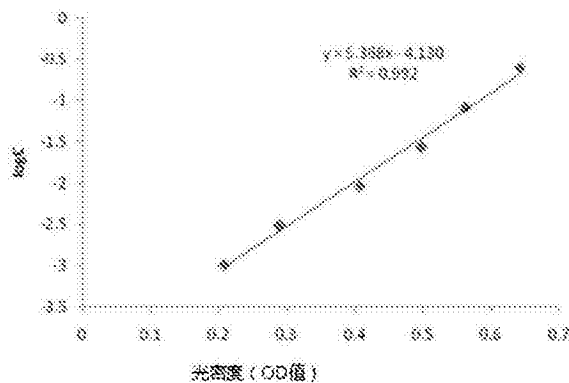
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54) 发明名称

一种鱼腥草注射液中抗原性物质检测方法

(57) 摘要

一种鱼腥草注射液中抗原性物质检测方法，通过鱼腥草药材或制剂经提取、浓缩、乙醇沉淀、超滤等步骤获得鱼腥草蛋白抗原性物质；通过鱼腥草抗原性物质与弗氏完全佐剂配制的标准抗原对家兔进行免疫处理得到标准血清抗体；通过 ELISA 法检测待测样品中相应的残留植物蛋白类抗原性物质限量。本发明首次根据抗原抗体免疫反应机理，建立了一种专属性强、灵敏度高的鱼腥草蛋白的 ELISA 检测方法，充分保障了鱼腥草注射液的临床用药的安全。



1. 一种鱼腥草注射液中抗原性物质检测方法,其特征在于步骤为:(1)通过鱼腥草药材或制剂经提取、浓缩、乙醇沉淀、超滤等步骤获得鱼腥草蛋白抗原性物质;(2)通过鱼腥草抗原性物质与弗氏完全佐剂配制的标准抗原对家兔进行免疫处理得到标准血清抗体;(3)通过ELISA法检测待测样品中相应的残留植物蛋白类抗原性物质限量。

2. 根据权利要求1所述鱼腥草注射液中抗原性物质检测方法,其特征在于步骤(1)中取鱼腥草药材,加水回流提取3次,滤过,合并滤液,滤液浓缩至相对密度 1.16 ± 0.01 (70℃)清膏,加乙醇至含醇量50wt.%-70 wt.%,静置过夜,滤过,取沉淀加水溶解,以截留分子量为5000-10000的超滤膜超滤,取截留液,浓缩后冷冻干燥,即得鱼腥草抗原性物质。

3. 根据权利要求1所述鱼腥草注射液中抗原性物质检测方法,其特征在于步骤(2)中使用鱼腥草抗原性物质与弗氏完全佐剂配制的标准抗原对家兔进行免疫处理,通过测定抗体滴度来判断抗体产生情况,分离抗血清;采用饱和硫酸铵对抗血清进行沉淀纯化得到标准抗体;所述标准抗原的浓度为5mg/mL-15mg/mL,免疫时间为7-28天;其中硫酸铵的饱和度为20%-50%,硫酸铵再通过透析、凝胶过滤方法去除。

4. 根据权利要求1所述鱼腥草注射液中抗原性物质检测方法,其特征在于步骤(3)中

a. 将权利要求2制备的鱼腥草抗原性物质与包被液按1:10的比例稀释后包被在酶标板上,封闭液封闭10-20分钟;包被过程应在0-4℃下进行,所述包被液为pH9.6的碳酸盐缓冲液,所述封闭液是浓度为0.5wt.%-2 wt.%的小牛血清白蛋白溶液;b. 将上述标准抗体加入至酶标板,孵育,洗板,其中孵育温度为37℃、孵育时间为1-3小时,所述标准抗体的浓度为 $0.5-1.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、加入量为100 μL ;再次,将100 μL 酶标抗体加入酶标板,孵育,洗板,其中酶标抗体为市售辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG,孵育温度为37℃孵育时间为1-3小时;

c. 向酶标板中分别加入100 μL 底物缓冲液和终止液;所述底物缓冲液为OPD/ H_2O_2 底物磷酸缓冲液,终止液为2mol/mL的硫酸;用酶标仪在490 nm处记录吸收度,以A490 nm值为纵坐标,抗原浓度的对数值为横坐标,进行非线性回归,得到非线性四参数回归方程;以A490 nm值为横坐标,抗原浓度的对数值为纵坐标,进行线性回归,得线性回归方程;按照阴性平均值加3倍标准偏差和阴性平均值加10倍标准偏差计算方法的检测限和定量限。

一种鱼腥草注射液中抗原性物质检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于中药注射制剂质量检查技术领域,具体而言,涉及鱼腥草注射液抗原性物质提取,抗鱼腥草抗原抗体制备,以及使用基于抗原-抗体反应原理建立的酶联免疫吸附法,对鱼腥草注射制剂中残留的抗原性物质进行检测的方法。

背景技术

[0002] 鱼腥草注射液是由鱼腥草单味药材制备而成,具有明显的抗菌、抗病毒、增强机体免疫力、抗炎、抗过敏、镇咳、降糖等作用,临床用于治疗呼吸道感染、病毒性肠炎、湿疹、恶性肿瘤。是医院临床常用的抗病毒产品,被列为《全国中医医院急诊科(室)必备中成药》,但从1988年至2006年期间,有关鱼腥草类的注射液严重不良反应报告已有222例,SFDA于2006年发布关于暂停使用和审批鱼腥草注射液等7个注射剂的通告。鱼腥草注射液其主要成分为挥发油,其制备工艺为水蒸气蒸馏法,在蒸馏过程中,鱼腥草中的植物蛋白会随着泡沫进入到蒸馏液中,从而给临床使用带来风险。

[0003] 现行的2010版《中华人民共和国药典》在“中药注射剂安全性检查法应用指导原则”中规定,过敏反应检查采用主动全身过敏试验(ASA),《中药、天然药物免疫毒性(过敏性、光过敏反应)研究的技术指导原则》中规定注射剂应进行主动全身过敏试验(ASA)和被动皮肤过敏试验(PCA)。ASA试验重在考查试验动物给予受试药物后,是否会发生过敏反应以及过敏反应发生的严重程度,主要依靠试验人员的观察,其结果不易量化,而且易受试验人员主观判断的影响,不能保证临床用药的安全。PCA试验重在考查试验动物给予受试物后是否产生抗体以及产生抗体的滴度,其试验结果可以直接通过蓝斑观察,但是不能观察到动物过敏反应症状。使用主动全身过敏试验(ASA)和被动皮肤过敏试验(PCA)检验合格的鱼腥草注射液,在临床应用中仍然会发生过敏反应,不能保证临床用药的安全。

发明内容

[0004] 解决的技术问题:本发明提供一种鱼腥草注射液中抗原性物质检测方法,该方法使用基于抗原-抗体反应原理建立的酶联免疫吸附法对注射液中的低浓度植物蛋白等抗原性物质进行检测。

[0005] 技术方案:一种鱼腥草注射液中抗原性物质检测方法,步骤为:(1)通过鱼腥草药材或制剂经提取、浓缩、乙醇沉淀、超滤等步骤获得鱼腥草蛋白抗原性物质;(2)通过鱼腥草抗原性物质与弗氏完全佐剂配制的标准抗原对家兔进行免疫处理得到标准血清抗体;(3)通过ELISA法检测待测样品中相应的残留植物蛋白类抗原性物质限量。

[0006] 步骤(1)中取鱼腥草药材,加水回流提取3次,滤过,合并滤液,滤液浓缩至相对密度 1.16 ± 0.01 (70℃)清膏,加乙醇至含醇量50wt.%-70wt.%,静置过夜,滤过,取沉淀加水溶解,以截留分子量为5000-10000的超滤膜超滤,取截留液,浓缩后冷冻干燥,即得鱼腥草抗原性物质。

[0007] 步骤(2)中使用鱼腥草抗原性物质与弗氏完全佐剂配制的标准抗原对家兔进行免

疫处理,通过测定抗体滴度来判断抗体产生情况,分离抗血清;采用饱和硫酸铵对抗血清进行沉淀纯化得到标准抗体;所述标准抗原的浓度为 5mg/mL-15mg/mL,免疫时间为 7-28 天;其中硫酸铵的饱和度为 20% -50%,硫酸铵再通过透析、凝胶过滤方法去除。

[0008] 步骤(3)中 a. 将上述制备的鱼腥草抗原性物质与包被液按 1:10 的比例稀释后包被在酶标板上,封闭液封闭 10-20 分钟;包被过程应在 0-4℃ 下进行,所述包被液为 pH9.6 的碳酸盐缓冲液,所述封闭液是浓度为 0.5wt. % -2wt. % 的小牛血清白蛋白溶液;b. 将上述标准抗体加入至酶标板,孵育,洗板,其中孵育温度为 37℃、孵育时间为 1-3 小时,所述标准抗体的浓度为 0.5-1.5mg · mL⁻¹、加入量为 100 μL;再次,将 100 μL 酶标抗体加入酶标板,孵育,洗板,其中酶标抗体为市售辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG,孵育温度为 37℃ 孵育时间为 1-3 小时;c. 向酶标板中分别加入 100 μL 底物缓冲液和终止液;所述底物缓冲液为 OPD/H₂O₂底物磷酸缓冲液,终止液为 2mol/mL 的硫酸;用酶标仪在 490nm 处记录吸收度,以 A490nm 值为纵坐标,抗原浓度的对数值为横坐标,进行非线性回归,得到非线性四参数回归方程;以 A490nm 值为横坐标,抗原浓度的对数值为纵坐标,进行线性回归,得线性回归方程;按照阴性平均值加 3 倍标准偏差和阴性平均值加 10 倍标准偏差计算方法的检测限和定量限。

[0009] 有益效果:《中国药典》现行的过敏反应检查方法采用主动全身过敏试验 (ASA) 和被动皮肤过敏试验 (PCA) 来判断药物是否会发生过敏反应,二种方法均不够量化,易受试验人员主观判断的影响,导致使用主动全身过敏试验 (ASA) 和被动皮肤过敏试验 (PCA) 检验合格的鱼腥草注射液,在临床应用中仍然会发生过敏反应,不能保证临床用药的安全。本发明则通过制备鱼腥草蛋白抗原性物质和家兔免疫血清抗体,采取 ELISA 法检测待测样品中相应的残留植物蛋白类抗原性物质限量。本发明首次根据抗原抗体免疫反应机理,建立了一种专属性强、灵敏度高的鱼腥草蛋白的 ELISA 检测方法,充分保障了鱼腥草注射液的临床用药的安全。

附图说明

[0010] 图 1 抗原在 1e⁻¹⁰-20mg/mL 浓度范围的参数非线性回归方程;

[0011] 图 2 鱼腥草蛋白 ELISA 检测法标准曲线。

具体实施方式

[0012] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出的是,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。文中饱和度含义为溶质在溶液中所占质量分数。

[0013] 实施例 1 鱼腥草注射液中鱼腥草抗原性物质的含量检测

[0014] 本研究是对鱼腥草注射液中可能的过敏物质——鱼腥草蛋白等抗原性物质,进行了抗原抗体制备研究,建立了 ELISA 检测方法,具有专属、灵敏、简单、快速、处理样品量大、特异性强、价格低廉等诸多优点,并可以用于指导企业生产。

[0015] 取鱼腥草药材,加 7 倍体积水回流提取 3 次,每次 3h,滤过,合并滤液,滤液浓缩至相对密度 1.16±0.01 (70℃) 的清膏,加乙醇至含醇量 50wt. %,静置过夜,滤过,取沉淀加水溶解,以截留分子量为 10000 的超滤膜超滤,取截留液,浓缩,冷冻干燥,即得鱼腥草蛋

白部位。Bradford 法（以牛血清白蛋白制备标准曲线），测得鱼腥草蛋白中的蛋白含量为 3.80%。

[0016] 使用所得鱼腥草抗原性物质对家兔进行免疫处理。鱼腥草抗原（用完全福氏佐剂配制）初次免疫家兔，每 3 周后抗原（用不完全福氏佐剂配制）分别进行第二次、第三次免疫，三次均采用皮内多点注射进行免疫；第三次免疫后一周，采血 1mL，分离血清，测定抗体滴度，判断抗体产生情况，如滴度达到检测上限，则一周后同法加强免疫一次，再一周后颈总动脉采血，分离血清，将相同抗原的血清合并，分装，-20℃冻存，用于纯化 IgG。

[0017] 取上述抗血清 5mL，分别加生理盐水 5mL 和饱和硫酸铵溶液 2.5mL 至硫酸铵的饱和度为 20%，4℃静置 30min，3000r/min 离心 20min，弃沉淀；取上清 10mL 加饱和硫酸铵溶液 10mL 至硫酸铵的饱和度为 50%，4℃静置 30min，3000r/min 离心 20min，弃上清液；沉淀溶于约 10mL 水中，再加饱和硫酸铵溶液 5mL 至硫酸铵的饱和度为 33%，4℃静置 30min，3000r/min 离心 20min，弃上清液，此步骤重复 3 次。沉淀溶于 20mL 生理盐水中，装入透析袋；以 2L 的生理盐水为透析液，4℃透析 24h，其间更换 2 次透析液以去除硫酸铵。纯化后的抗体转移到适当的容器中，Bradford 法测定蛋白浓度，将纯化的抗体用生理盐水稀释成 1mg/mL，加入青链霉素混合液防腐，4℃储存备用。

[0018] 鱼腥草注射液中抗原性物质限量检查方法：

[0019] (1) 标准曲线的制备，检测线、定量限的确定

[0020] 鱼腥草抗原用包被液按 1:10 的体积比例稀释，包被液为 pH9.6 的碳酸盐缓冲液，包被在 96 孔聚乙烯酶标板上，4℃湿盒过夜，PBS 洗 2 遍，用 2wt.% 小牛血清白蛋白溶液（溶剂为 PBS 溶液，pH 7.4）封闭 10min，加入 100 μL 1:1000 (PBS) 稀释的兔抗鱼腥草血清（一抗）孵育 2h，PBS 洗 5 遍，加入 100 μL 1:10000 (PBS) 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 溶液（二抗）孵育 2h，PBS 洗 5 遍，加 100 μL OPD/H₂O₂ 底物磷酸缓冲液，最后加 100 μL 的 2mol/L 硫酸终止反应，用酶标仪在 490nm 处记录吸收度。以 A_{490nm} 值为纵坐标，抗原浓度的对数值为横坐标，进行非线性回归，得到非线性四参数回归方程： $Y = (0.111 - 0.627) / (1 + (x/0.006)^{0.805}) + 0.627$ ， $r^2 = 0.994$ ，在 1-100 μg/mL 呈明显的线性（以残留蛋白计 0.038-3.8 μg·mL⁻¹），结果见图 1。因此，以 A_{490nm} 值为横坐标，抗原浓度的对数值为纵坐标，进行线性回归，得线性回归方程： $Y = 5.368X - 4.130$ ， $r^2 = 0.992$ ，线性范围：1-100 μg/mL，结果见图 2。分别按照阴性平均值加 3 倍标准偏差和阴性平均值加 10 倍标准偏差（n = 12，重复次数 = 6）计算方法的检测限和定量限约为 0.26 和 0.38 μg/mL，结果见表 1。由于所制备的鱼腥草抗原的蛋白含量约为 3.8%，因此本方法对抗原活性杂质的检测限和定量限约为 9.88 和 14ng/mL。

[0021] 表 1. ELISA 检测法的检测限及定量限

[0022]

	OD						OD 均值	限定浓度 μg/mL
	1 n=10	2 n=12	3 n=12	4 n=12	5 n=12	6 n=3		
检测限	0.095	0.138	0.095	0.086	0.1	0.097	0.1018	0.26
定量限	0.123	0.197	0.122	0.107	0.134	0.112	0.1325	0.38

[0023] (2) 样品中痕量鱼腥草抗原性物质的测定

[0024] 取供试品溶液,按照标准曲线项下,自“包被在 96 孔聚乙烯酶标板上,4℃湿盒过夜”起,依法测定吸收度,计算鱼腥草抗原的含量。

[0025] 鱼腥草注射液中鱼腥草抗原性物质的含量应不得高于 9.88ng/mL。

[0026] 实施例 2 两种工艺的鱼腥草注射液过敏试验检测方法比较

[0027] 原工艺注射液(水蒸汽蒸馏):取鱼腥草,粉碎,过 2 号筛;称取 1kg 鱼腥草粉末进行水蒸汽蒸馏,收集初馏液 500mL,将 7.5g 2-羟丙基-β-环糊精溶解于上述初馏液中,60℃磁力搅拌 3h,加入适量的氯化钠溶解,注射用水定容至 500mL,过滤,灭菌,即得。

[0028] 新工艺注射液(超临界萃取):取鱼腥草,粉碎,过 2 号筛;称取 1kg 鱼腥草粉末进行二氧化碳超临界萃取,萃取压力为 25MPa,温度为 45℃,萃取 90min,得超临界萃取物;加入 1.5% 2-羟丙基-β-环糊精溶液,60℃磁力搅拌 3h,加入适量的氯化钠溶解,注射用水定容至 500mL,过滤,灭菌,即得。

[0029] 将两种注射液分别按照中国药典的主动全身过敏试验(ASA)、被动皮肤过敏试验(PCA)和本发明的特异性 ELISA 方法进行检验,结果两种注射液主动全身过敏试验(ASA)、被动皮肤过敏试验(PCA)均为合格;依据本发明的特异性 ELISA 方法进行检测,结果水蒸汽蒸馏原工艺制备的注射液结果不合格,而采取超临界萃取工艺制备的新注射液检测结果合格。说明本发明的方法专属性强、灵敏度高,有效保障了鱼腥草注射液的临床用药的安全。

[0030] 表 2. 两种工艺的鱼腥草注射液过敏试验检测方法比较

[0031]

样品	主动全身过敏试验	被动皮肤过敏试验	特异性 ELISA 检测
原工艺注射液	合格	合格	不合格
新工艺注射液	合格	合格	合格

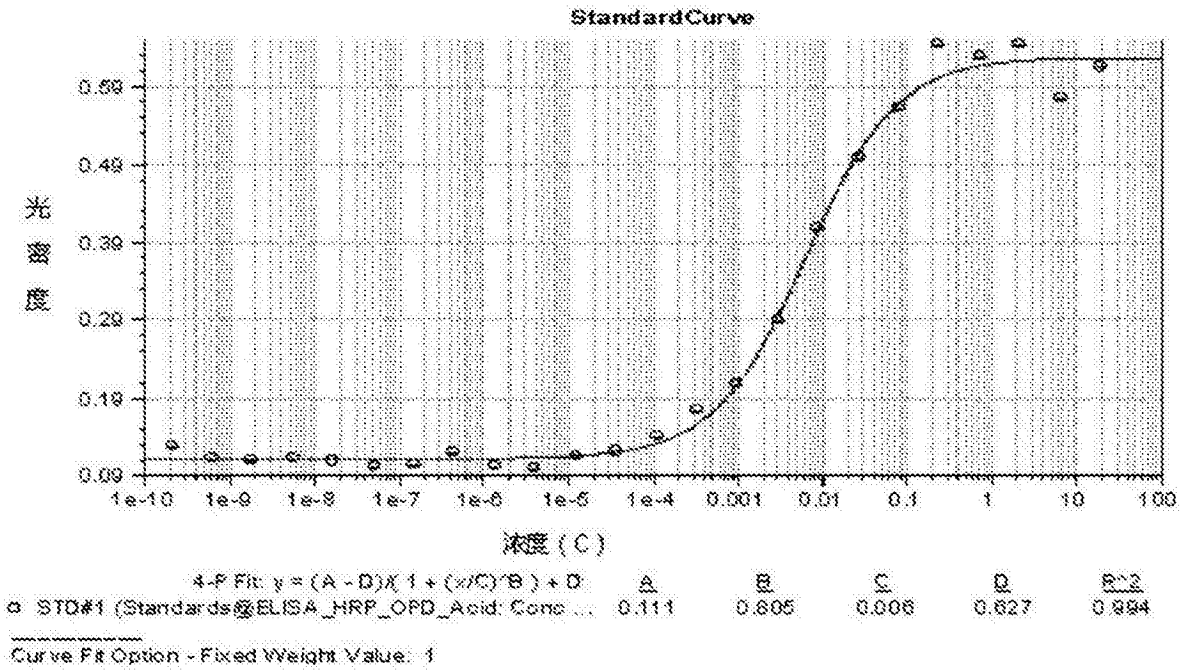


图 1

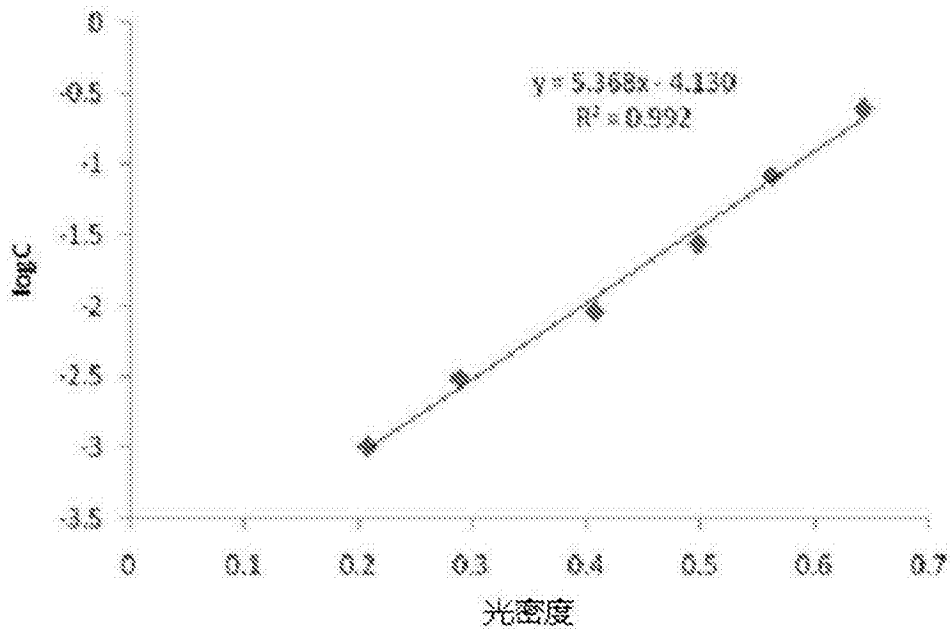


图 2

专利名称(译)	一种鱼腥草注射液中抗原性物质检测方法		
公开(公告)号	CN105301231A	公开(公告)日	2016-02-03
申请号	CN201510651353.2	申请日	2015-10-10
[标]申请(专利权)人(译)	南京中医药大学		
申请(专利权)人(译)	南京中医药大学		
当前申请(专利权)人(译)	南京中医药大学		
[标]发明人	程建明 朱丹凤 林瑛 帅维维 柴尧 彭九嫚		
发明人	程建明 朱丹凤 林瑛 帅维维 柴尧 彭九嫚		
IPC分类号	G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/535		
其他公开文献	CN105301231B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种鱼腥草注射液中抗原性物质检测方法，通过鱼腥草药材或制剂经提取、浓缩、乙醇沉淀、超滤等步骤获得鱼腥草蛋白抗原性物质；通过鱼腥草抗原性物质与弗氏完全佐剂配制的标准抗原对家兔进行免疫处理得到标准血清抗体；通过ELISA法检测待测样品中相应的残留植物蛋白类抗原性物质限量。本发明首次根据抗原抗体免疫反应机理，建立了一种专属性强、灵敏度高的鱼腥草蛋白的ELISA检测方法，充分保障了鱼腥草注射液的临床用药的安全。

