

中国食品药品检验检测技术系列丛书



生物制品检验 技术操作规范

中国食品药品检定研究院 组织编写



中国健康传媒集团
中国医药科技出版社

内 容 提 要

本书为《中国食品药品检验检测技术系列丛书》之一，其内容主要包括通用检测方法和各类生物制品的特异性检测方法。通用检测方法，只收录了至少两大类制品共同使用的方法，有些方法虽然在某一大类多个制品中使用但也未列入，只是在具体制品中收录。对于具有复杂性的通用检测方法（如：对不同制品可能在具体的操作环节、判断标准等方面存在不同，或者含有多种原理的方法等），都经过各使用单位认真核对、整合，并描述清楚。各类生物制品的特异性检测方法，包括细菌类疫苗、病毒类疫苗、重组生物制品、血液制品和其他生物制品等共五大类生物制品的特异性检测方法。各类收载具体品种，以《中国药典》2015年版三部所收载制品为主，同时增加可能在2020年版《中国药典》新增的品种。全书以详细介绍检测方法为主，对每一种检测方法的原理只作简单介绍，对所用试剂以及环境也予以明确要求，重点细化具体的操作细节、结果计算与结果判断，使其具有实用性和可操作性强的特点。

本书主要适合生物制品生产企业、检验机构使用，也可作为大专院校、科研单位相关专业技术人员参考用书。

图书在版编目（CIP）数据

生物制品检验技术操作规范 / 中国食品药品检定研究院组织编写. —北京：中国医药科技出版社，2019.8

（中国食品药品检验检测技术系列丛书）

ISBN 978-7-5214-1173-7

I. ①生… II. ①中… III. ①生物制品—检验—技术操作规程 IV. ①TQ464-65

中国版本图书馆CIP数据核字（2019）第150380号

中国食品药品检验检测技术系列丛书

生物制品检验技术操作规范

美术编辑 陈君杞

版式设计 易维鑫

出版 中国健康传媒集团 | 中国医药科技出版社

地址 北京市海淀区文慧园北路甲22号

邮编 100082

电话 发行：010-62227427 邮购：010-62236938

网址 www.cmstp.com

规格 787×1092mm 1/16

印张 26 3/4

字数 609千字

版次 2019年8月第1版

印次 2019年8月第1次印刷

印刷 三河市万龙印装有限公司

经销 全国各地新华书店

书号 ISBN 978-7-5214-1173-7

定价 398.00元

版权所有 盗版必究

举报电话：010-62228771

本社图书如存在印装质量问题请与本社联系调换

《中国食品药品检验检测技术系列丛书》

编 委 会

主任委员 李 波

副主任委员 张志军 邹 健 姚雪良 路 勇 王佑春

委 员 (按姓氏笔画排序)

丁 宏 马双成 王会如 王佑春 王海燕 白东亭 成双红

许明哲 许鸣镝 孙 磊 孙会敏 李 波 杨 振 杨 锐

杨会英 杨国伟 杨昭鹏 杨美成 何 骏 余新华 邹 健

沈 琦 张庆生 张志军 陈鸿波 周 巍 郑 佳 孟志平

赵 霞 胡 梅 柳全明 施燕平 姚雪良 贺争鸣 徐 苗

郭景文 涂家生 黄 瑛 黄宝斌 黄鸿新 龚声瑾 崔生辉

路 勇 霍胜楠

《生物制品检验技术操作规范》

编 委 会

主 编 王佑春 张志军

副 主 编 沈 琦 徐 苗

顾 问 王军志 李凤祥 董关木

编 委 (按姓氏笔画排序)

丁有学	丁晓丽	于 雷	马 霄	马秋平	王 兰	王 玲
王 威	王 斌	王云鹏	王丽婵	王春娥	王敏力	王绿音
王箐舟	毛群颖	卞莲莲	方 鑫	孔 艳	石继春	石磊泰
卢锦标	叶 强	田万红	史新昌	付丽丽	权娅茹	毕 华
吕 萍	刘 兰	刘 艳	刘欣玉	刘悦越	刘晶晶	江 征
孙 亮	孙 悦	苏 城	杜加亮	李 加	李 红	李 响
李 萌	李 康	李 晶	李 懿	李长贵	李玉华	李永红
李亚南	李江姣	李茂光	李湛军	杨 蕾	杨英超	杨靖清
吴 星	邱少辉	何 鹏	余晴川	辛晓芳	沈小兵	张 伟
张 峰	张 慧	张 影	张华捷	张园园	陈 莹	陈 琼
陈度宇	武 刚	范文红	国 泰	周 勇	周 倩	郑红梅
赵 卉	赵爱华	郝 杰	胡 玥	胡忠玉	侯继锋	俞小娟
饶春明	姚文荣	秦 玺	都伟欣	贾丽丽	徐 潇	徐可铮
徐宏山	徐康维	徐颖华	高 帆	高加梅	郭 莹	陶 磊
曹守春	崔晓雨	梁成罡	梁争论	梁昊宇	梁誉龄	董思国
韩春梅	喻 钢	鲁 旭	曾 明	蔡 彤	裴德宁	管利东
谭亚军	魏 东					

前言

Foreword

自 1996 年开始, 中国食品药品检定研究院(原中国药品生物制品检定所)为配合《中国药典》等国家药品标准实施, 组织全国药品检验系统专家连续四次编撰出版《中国药品检验标准操作规范》(1996 年、2000 年、2005 年和 2010 年)和《药品检验仪器操作规程》(2005 年和 2010 年), 旨在推动全国药品检验系统检验方法和仪器操作的规范化。

党中央、国务院和地方各级政府历来高度重视食品药品监管工作。作为监管的重要技术支撑, 检验机构在产品上市前和上市后的监管中发挥越来越重要的作用。随着我国药品、医疗器械、食品、化妆品产品质量要求的不断提高, 检验技术的不断进步, 检验领域的不断扩大, 检验检测操作的进一步规范更显迫切。在既往工作的基础上, 中国食品药品检定研究院组织全国药品、医疗器械、食品、化妆品检验检测机构的专家编撰《中国食品药品检验检测技术系列丛书》。

本套《丛书》涵盖药品、医疗器械、食品、化妆品检验检测操作规范、仪器操作规程及疑难问题解析等内容, 并介绍了检验检测新技术、新方法、新设备的应用, 具有较强的实用性和可操作性。将为促进医药产业发展, 发挥技术支撑功能, 提升药品监管水平起到重要作用。

《生物制品检验技术操作规范》是系列丛书之一。

生物制品发展很快, 2015 年版《中国药典》收载了 137 个品种, 对每个品种都有明确的工艺、过程控制以及产品质量的要求, 而且在通则中还收载了具体的检测方法。生物制品的检验是保障生物制品质量的重要环节, 而生物制品为复杂的大分子, 其质量检测往往涉及分子结构、活性、稳定性以及生物材料等, 具有其本身的复杂性。中国食品药品检定研究院生物制品检定所(以下简称生检所)一直从事生物制品检测方法的研究以及新方法建立的工作, 并承担着所有生物制品的检定任务, 在长期的工作中形成了一套具体的检测规范, 对保障我国生物制品的质量发挥了重要的作用。在此基础上, 编撰了《生物制品检验技术操作规范》。编写本书的主要目的就是梳理、汇总生检所的检测规范, 为生物制品研制、生产以及检验行业提供详细的检测方法, 保证方法的一致性, 更好地执行《中国药典》标准。

本书包括了通用检测方法和各类制品的特异性检测方法。其中通用检测方法只收

录了至少两大类制品共同使用的方法，有些方法虽然在某一大类多个制品中使用但并未列入，只是在具体制品中收录。有些通用检测方法也存在一些复杂性，如：对不同制品可能在具体的操作环节、判断标准等方面存在不同，或者含有多种原理的方法等，对这些问题都经过各使用单位认真核对、整合，并描述清楚。将各类生物制品梳理后分为五大类，即：细菌类疫苗、病毒类疫苗、重组生物制品、血液制品和其他生物制品。品种的选择是以 2015 年版《中国药典》三部所收录的制品为主，同时增加可能在 2020 年版《中国药典》新增的品种。对每一具体制品，可能由于来源不同、工艺不同等存在多种制品，对这些制品其大部分检测项目甚至包括特异性检测项目可能是相同的，为减少重复，将其整合并描述清楚。

本书以描述详细的检测方法为主，对每一种检测方法的原理进行了简单描述，对所用试剂以及环境也有明确的要求，细化了具体的操作细节、结果计算以及结果判断，使其具有较强的可操作性。在具体制品部分除了对特异性检测方法进行描述以外，对制品的特性也做了简单的介绍，使读者可获得必要的制品信息。编写本书的人员均为生检所长期从事生物制品检定的业务骨干，具有丰富的实际操作以及复杂问题的处理经验。而且在编写过程中经过多次集体讨论，互相取长补短，形成格式和内容的协调一致。各科室主任高度重视，认真组织编写，严格审核把关。陈保文作为该书的秘书，做了大量的协调和组织工作。对大家付出的辛勤劳动表示衷心感谢。

本书是生检所几代专业技术人员实验操作的技术结晶，其出版发行将为生物制品行业提供一本很有价值的检测工具书，具有很强的实用性、可操作性，不仅仅适用于生物制品研发企业和检测单位，也同样适用于大专院校以及科研单位。

当然，由于时间所限，编写内容可能存在一些不足，还请广大读者批评指正。

编委会
2019 年 6 月

目录

Contents

通用检测方法	1
外观检查法	2
装量及装量差异检查法	3
最低装量检查法	4
可见异物检查法	6
真空度检查法	8
不溶性微粒检查法（光阻法）	9
pH 值测定法	11
渗透压摩尔浓度测定法	12
氯化钠测定法	14
氢氧化铝测定法	16
硫柳汞测定法	19
苯酚测定法（滴定法）	21
蛋白质含量测定法	22
水分测定法	27
游离甲醛测定法	28
聚乙二醇残留量测定法	32
抗生素残留量测定法	34
牛血清白蛋白残留量测定法	38
外源性 DNA 残留量测定法	39
宿主细胞蛋白质残留量检测	47
无菌检查法	49
异常毒性检查法	54
热原检查法	55
细菌内毒素检查法	58
等电点测定法	66
N 端氨基酸序列测定法	68
纯度及分子量测定法（SDS - PAGE 电泳法）	70
重组细胞因子产品肽图检查法	73
重组细胞因子产品纯度测定法（反相高效液相色谱法）	75

重组细胞因子产品蛋白质纯度测定法（分子排阻高效液相色谱法）	77
-------------------------------	----

细菌类疫苗特异性项目检测方法 79

百白破疫苗	80
脑膜炎球菌疫苗	93
23 价肺炎球菌多糖疫苗	106
b 型流感嗜血杆菌结合疫苗	113
皮内注射用卡介苗	117
伤寒 Vi 多糖疫苗	126
霍乱疫苗	132
皮上划痕用鼠疫活疫苗	141
皮上划痕人用布氏菌活疫苗	146
皮上划痕人用炭疽活疫苗	151
钩端螺旋体疫苗	155

病毒类疫苗特异性项目检测方法 160

流感病毒裂解疫苗	161
麻疹风疫苗及联合减毒活疫苗	165
脊髓灰质炎减毒活疫苗	171
脊髓灰质炎灭活疫苗	181
肠道病毒 71 型灭活疫苗	185
轮状病毒疫苗	189
冻干甲型肝炎减毒活疫苗	196
甲型肝炎灭活疫苗	200
重组乙型肝炎疫苗	203
戊型肝炎疫苗	207
水痘疫苗	211
双价肾综合征出血热灭活疫苗	216
人用狂犬病疫苗	218
乙型脑炎减毒活疫苗	225
冻干乙型脑炎灭活疫苗（Vero 细胞）	230
森林脑炎灭活疫苗	237
黄热减毒活疫苗	239

重组类生物制品特异性项目检测方法 243

重组人胰岛素	244
重组人生长激素	259
尼妥珠单抗注射液	267
重组人促红素	283

干扰素·····	290
重组人白介素-2·····	295
白细胞介素-11·····	299
重组人粒细胞刺激因子·····	302
重组人粒细胞巨噬细胞刺激因子·····	306
重组牛碱性成纤维细胞生长因子·····	309
重组人表皮生长因子·····	311
重组链激酶·····	313
神经生长因子·····	315

血液制品特异性项目检测方法 325

人血白蛋白·····	326
静注人免疫球蛋白及特异性人免疫球蛋白·····	340
人凝血因子类产品·····	354

其他生物制品特异性项目检测方法 370

抗血清制品·····	371
变应原制品·····	387
微生态活菌制品·····	399
注射用 A 型肉毒毒素·····	406
结核菌素纯蛋白衍生物和卡介菌纯蛋白衍生物·····	409

外观检查法

1 原理

外观系指在规定条件下,用肉眼观察到的制品特征,如液体制品及冻干制品复溶后的颜色、澄明度、黏稠度、冻干后的块状物的颜色、疏松程度、有无融化迹象等。这些特征与蛋白质特性、制品的纯度、含有的非目的蛋白质的种类、蛋白质含量、生产工艺等有关。注射剂在符合药品生产质量管理规范(GMP)的条件下生产,产品在出厂前应采用适宜的方法逐一进行外观检查并同时剔除不合格的产品。

2 材料和设备

澄明度检测仪,光源[采用日光灯光源(光照度可在1000~4000lx范围内调节)],式样(为伞棚式,单面用),背景[2/3为不反光黑色,1/3为不反光白色(供检查有色异物)]。

3 检查人员条件

视力:远距离和近距离视力测验均为4.9或4.9以上(矫正视力应为5.0或5.0以上);应无色盲。

4 操作方法

按各类供试品的要求,取规定量供试品,除去容器标签,擦净瓶外壁污痕,放室温静置一定时间(人血白蛋白和人免疫球蛋白类制品一般放置过夜),必要时将药液转移至洁净透明的适宜容器内。手持供试品容器瓶颈部置于遮光板边缘处,轻轻旋转和翻转容器,使制品中可能存在的可见异物悬浮(注意不要产生气泡),在明视距离(指供试品至人眼的清晰观测距离,通常为25cm),分别在黑色和白色背景下目视检查,重复观察,检查总时限为20秒。供试品装量每支(瓶)在10ml及10ml以下的每次检查拿取2支(瓶),10ml以上每次检查拿取1支(瓶),50ml或50ml以上注射液按直、横、倒三步法旋转检视。整个检查过程应在规定时限中进行。

用无色透明容器包装的无色供试品溶液,检查时被观察供试品所在处的光照度应为1000~1500lx;用透明塑料容器包装、棕色透明容器包装的供试品或有色供试品溶液,光照度应为2000~3000lx;混悬型供试品或乳状液,光照度应增加至约4000lx。

注射液:除另有规定外,取供试品20支(瓶),按上述方法检查。

注射用冻干制剂:除另有规定外,取供试品5支(瓶),用适宜的溶剂和适宜的方法将供试品完全溶解后,按上述方法检查。配带有专用溶剂的注射用无菌制剂,应先将专用溶剂按注射液要求检查并符合注射液的规定后,再用其溶解注射用无菌制剂。如经真空处理供试品,必要时用适宜的方法破其真空,以便于供试品溶解。低温冷藏的品种,将其平衡至规定的温度后,再进行溶解和检查。冻干的细菌类活疫苗和分枝杆菌类生物制品采用直接观察法检测外观,观察样品的性状和色泽,需对其性状及色泽进行描述,同时记录制品加入复溶剂后完全溶解的复

溶时间。

5 结果判定

参照《中国药典》2015年版三部各论各制品相关规定。

6 注意事项

6.1 供试品应放置待气泡消失后再进行检测（冰箱放置样品要平衡至室温）。

6.2 检查时发现瓶盖松动或有微量沉积物的供试品需做无菌检查。

6.3 冻干制剂需按各制品中正文规定的温度及方法复溶。

6.4 含铝佐剂供试品静置时为无色上清液和白色沉淀，摇匀后呈乳白色混悬液体，可因沉淀而分层，易摇散；“摇不散的块状物”指摇不散的最大粒径超过 2mm 的块状物（参照可见异物）。

起草人：赵卉 郝杰

复核人：侯继锋 王菁舟

装量及装量差异检查法

1 简介

装量及装量差异检查法适用于《中国药典》2015年版三部通则 0102 中所涉及的方法。装量检查适用于标示装量为 50ml 及 50ml 以下的液体制剂；装量差异检查适用于无菌粉末制剂。

2 材料和设备

带针头注射器，经标化的量筒，经计量的精密天平。

3 操作方法

3.1 装量检查 供试品标示装量不大于 2ml 者，取供试品 5 支（瓶）；2ml 以上至 50ml 者，取供试品 3 支（瓶）。开启时注意避免损失，将内容物分别用相应体积的干燥注射器及注射针头抽尽，然后缓慢连续地注入经标化的量入式量筒内（量筒的大小应使待测体积至少占其额定体积的 40%，不排尽针头中的液体），在室温下检视。每支（瓶）的装量均不得少于其标示量。

生物制品多剂量供试品：取供试品 1 支（瓶），按标示的剂量数和每剂的装量，分别用注射器抽出，按上述步骤测定单次剂量，应不低于标示量。

标示装量为 50ml 以上的注射剂按照最低装量检查法检查，应符合规定。

也可采用重量除以相对密度计算装量。准确量取供试品，精密称定，求出每 1ml 供试品的

重量（即供试品的相对密度）；精密称定用干燥注射器及注射针头抽出或直接缓慢倾出供试品内容物的重量，再除以供试品相对密度，得出相应的装量。

预装式注射器和弹筒式装置的供试品：标示装量不大于 2ml 者，取供试品 5 支（瓶）；2ml 以上至 50ml 者，取供试品 3 支（瓶）。供试品与所配注射器、针头或活塞装配后将供试品缓慢连续注入容器（不排尽针头中的液体），按单剂量供试品要求进行装量检查，应不低于标示量。

3.2 装量差异检查 除另有规定外，取供试品 5 瓶（支），除去标签、铝盖，容器外壁用乙醇擦净，干燥，开启时注意避免玻璃屑等异物落入容器中，分别迅速精密称定；容器为玻璃瓶的注射用无菌粉末，首先小心开启内塞，使容器内外气压平衡，盖紧后精密称定。然后倾出内容物，容器用水或乙醇洗净，在适宜条件下干燥后，再分别精密称定每一容器的重量。

4 记录与结果计算

4.1 装量检查 记录标示装量、室温、量筒及注射器规格、每次检视或称量数据，按规定进行判断。

4.2 装量差异检查 记录标示装量、室温、天平编号，记录每个供试品重量与每个供试品空容器重量，求出每瓶（支）的装量。每瓶（支）装量与平均装量相比较（如有标示装量，则与标示装量相比较），应符合下列规定，如有 1 瓶（支）不符合规定，应另取 10 瓶（支）复试，应符合规定（表 1）。

表 1 装量差异限度

标示装量或标示装量	装量差异限度
$\leq 0.05\text{g}$	$\pm 15\%$
0.05~0.15g（含）	$\pm 10\%$
0.15~0.50g（含）	$\pm 7\%$
$> 0.50\text{g}$	$\pm 5\%$

起草人：王斌

复核人：曾明

最低装量检查法

1 原理

用称重或者体积测定的方法检查供试品的装量。

2 材料和设备

分析天平、经标化的吸管/注射器/干燥量筒等。

3 操作方法

3.1 重量法（适用于标示装量以重量计的制剂）

3.1.1 除另有规定外，取供试品 5 个（50g 以上者 3 个），除去外盖和标签，容器外壁用适宜方法清洁并干燥，分别精密称定重量 m_0 。

3.1.2 除去内容物，容器用适宜的溶剂洗净并干燥，分别精密称定空容器的重量 m_1 ；则制剂的装量 $m = m_0 - m_1$ 。

3.2 容量法（适用于标示装量以容量计的制剂）除另有规定外，取供试品 5 个（50ml 以上者 3 个），开启时注意避免损失，将内容物转移至预经标化的吸管/注射器/干燥量筒中；黏稠液体倾出后，除另有规定外，将容器倒置 15 分钟。读取每个容器内容物的装量。

4 结果计算

计算 5 个（或 3 个）供试品的平均装量。

5 结果与判定

应符合表 1 规定；如有 1 个容器装量不符合规定，则另取原数量供试品复试，应全部符合规定。

表 1 装量限度要求

标示装量	注射液及注射用浓溶液		口服及外用固体、半固体、液体； 黏稠液体	
	平均装量	每个容器装量	平均装量	每个容器装量
20g (ml) 以下	/	/	不少于标示装量	不少于标示装量的 93%
20g (ml) 至 50g (ml)	/	/	不少于标示装量	不少于标示装量的 95%
50g (ml) 以上	不少于标示装量	不少于标示装量的 97%	不少于标示装量	不少于标示装量的 97%

6 注意事项

操作过程中注意避免供试品的损失。

起草人：鲁旭

复核人：王斌

可见异物检查法

1 原理

可见异物是指存在于注射剂、眼用液体制剂和无菌原料药中，在规定条件下目视可以观测到的不溶性物质，其粒径或长度通常大于 $50\mu\text{m}$ 。注射剂在符合药品生产质量管理规范（GMP）的条件下生产，产品在出厂前应采用适宜的方法逐一进行外观检查并同时剔除不合格的产品。临用前，需在自然光下目视检查（避免阳光直射），如有可见异物，不得使用。可见异物检查法有灯检法和光散射法，血液制品一般常用灯检法。灯检法不适用的品种，如深色透明容器包装或液体色泽较深（一般深于各标准比色液 7 号）的品种可选用光散射法；混悬型、乳状液型注射剂和滴眼液不能使用光散射法。

2 材料和设备

澄明度检测仪，光源[采用日光灯光源（光照度可在 $1000\sim 4000\text{lx}$ 范围内调节）]，式样（为伞棚式，单面用），背景[$2/3$ 为不反光黑色， $1/3$ 为不反光白色（供检查有色异物）]。

3 检查人员条件

视力：远距离和近距离视力测验均为 4.9 或 4.9 以上（矫正视力应为 5.0 或 5.0 以上）；应无色盲。

4 操作方法

按各类供试品的要求，取规定量供试品，除去容器标签，擦净瓶外壁污痕，放室温静置一定时间（人血白蛋白和人免疫球蛋白类制品一般放置过夜），必要时将药液转移至洁净透明适宜容器内。手持供试品容器瓶颈部置于遮光板边缘处，轻轻旋转和翻转容器，使制品中可能存在的可见异物悬浮（注意不要产生气泡），在明视距离（指供试品至人眼的清晰观测距离，通常为 25cm ），分别在黑色和白色背景下目视检查，重复观察，检查总时限为 20 秒。供试品装量每支（瓶）在 10ml 及 10ml 以下的每次检查拿取 2 支（瓶）， 10ml 以上每次检查拿取 1 支（瓶）， 50ml 或 50ml 以上注射液按直、横、倒三步法旋转检视。整个检查过程应在规定时限中进行。

用无色透明容器包装的无色供试品溶液，检查时被观察供试品所在处的光照度应为 $1000\sim 1500\text{lx}$ ；用透明塑料容器包装、棕色透明容器包装的供试品或有色供试品溶液，光照度应为 $2000\sim 3000\text{lx}$ ；混悬型供试品或乳状液，光照度应增加至约 4000lx 。

注射液：除另有规定外，取供试品 20 支（瓶），按上述方法检查。

注射用冻干制剂：除另有规定外，取供试品 5 支（瓶），用适宜的溶剂和适宜的方法将供试品完全溶解后，按上述方法检查。配带有专用溶剂的注射用无菌制剂，应先将专用溶剂按注射液要求检查并符合注射液的规定后，再用其溶解注射用无菌制剂。如经真空处理供试品，必

要用适宜的方法破其真空，以便于供试品溶解。低温冷藏的品种，将其平衡至规定的温度后，再进行溶解和检查。

5 结果判定

供试品中均不得检出金属屑、玻璃屑、长度超过 2mm 的纤维、最大粒径超过 2mm 的块状物以及静置一定时间后轻轻旋转时肉眼可见的烟雾状微粒沉积物、无法计数的微粒群或摇不散的沉淀，以及在规定时间内较难计数的蛋白絮状物等明显可见异物。

供试品中如检出点状物、2mm 以下的短纤维和块状物等微细可见异物，若检出小于约 1mm 的细小蛋白絮状物或蛋白颗粒等微细可见异物，除另有规定外，应分别符合表 1 中的规定。

表 1 微细可见异物限度

类别	微细可见异物限度	
	初试 20 支（瓶）	初、复试 40 支（瓶）
注射液	装量 50ml 及以下，每支（瓶）中微细可见异物不得超过 3 个；	2 支（瓶）以上超出，不符合规定
	装量 50ml 以上，每支（瓶）中微细可见异物不得超过 5 个； 如有 1 支（瓶）超出，符合规定； 如有 2 支（瓶）超出，复试； 如有 3 支（瓶）及以上超出，不符合规定	
注射用无菌制剂	初试 5 支（瓶）	初复试 15 支（瓶）
	复溶体积 50ml 及以下，每支（瓶）中微细可见异物不得超过 3 个； 复溶体积 50ml 以上，每支（瓶）中微细可见异物不得超过 5 个； 如有 1 支（瓶）超出，复试	2 支（瓶）及以上超出，不符合规定

6 注意事项

6.1 供试品应放置待气泡消失后再进行检测（冰箱放置样品要平衡至室温）。

6.2 检查时发现瓶盖松动或有微量沉积物的供试品需做无菌检查。

6.3 冻干制剂需按各制品中正文规定的温度及方法复溶。

6.4 实验室检测时应避免引入可见异物。当制备注射用无菌制剂供试品溶液时，或供试品的容器不适用于检查（如透明度不够、不规则形状容器等），需转移至适宜容器中时，均应在 B 级的洁净环境中进行。

起草人：赵卉 郝杰

复核人：王菁舟 侯继锋

真空度检查法

1 原理

真空度是指一个空间内气体分子数的密度比标准状态下（一个大气压 101325Pa）少。电火花真空检测器利用高压变压器将 220V 交流电压升高到 2500V 或 3000V，使发射器两电极间发生火花放电，产生高频电流，并将高频电流馈送至串联的谐振电路中，再经高频变压器升压至 180~210kV，最后在尖端电极上放射出强力火花。在检测玻璃真空器件真空度时，强力火花打在有真空的玻璃瓶壁上火花会集中到一条线，可观察到瓶子里面产生一种辉光。如果是非真空的，火花呈伞装在瓶壁表面游离。

2 材料和设备

供试品，电火花真空检测器。

3 操作方法

3.1 供试品准备 将供试品从外包装中取出后，平衡至室温，清理干净瓶壁，并在暗室中排列好。

3.2 测定方法

3.2.1 接通电源，打开开关。

3.2.2 用电火花真空检测器对准供试品容器侧壁处测试。

4 结果判定

肉眼观察，供试品容器内出现辉光者为真空度合格，否则为不合格。

5 注意事项

测试时，真空检测器应避免容器壁上的内容物，以免出现焦化。

起草人：石继春 徐潇

复核人：叶强

不溶性微粒检查法（光阻法）

1 原理

采用智能微粒检测仪检测存在于注射剂中的不溶性微粒，原理为当液体中的微粒通过一窄细检测通道时，与液体流向垂直的入射光，由于被微粒阻挡而减弱，因此由传感器输出的信号降低，这种信号变化与微粒的截面积大小相关。

2 材料和设备

智能微粒检测仪，层流净化台或洁净间，微孔滤膜（ $\leq 1.0\mu\text{m}$ ）及其过滤器等。

3 操作方法

3.1 试验环境及检测 试验操作环境应不得引入外来微粒，测定前的操作应在层流净化台或符合规定的洁净操作间中进行。玻璃仪器和其他所需的用品均应洁净、无微粒。本法所用微粒检查用水（或其他适宜溶剂），使用前须经不大于 $1.0\mu\text{m}$ 的微孔滤膜滤过。取微粒检查用水（或其他适宜溶剂）50ml，按相应检查法项下规定的方法测定。

光阻法要求每 10ml 中含 $10\mu\text{m}$ 及 $10\mu\text{m}$ 以上的不溶性微粒应在 10 粒以下，含 $25\mu\text{m}$ 及 $25\mu\text{m}$ 以上的不溶性微粒应在 2 粒以下。否则表明微粒检查用水（或其他适宜溶剂）、玻璃仪器或试验环境不适于进行微粒检查，应重新处理，检测符合规定后方可进行供试品检查。

3.2 供试品测定

3.2.1 标示装量为 25ml 或 25ml 以上静脉用注射液或注射用浓溶液 除另有规定外，取供试品至少 4 个，分别按以下方法测定：用水将容器外壁洗净，小心翻转 20 次，使溶液混合均匀，立即小心开启容器，先倒出部分供试品溶液冲洗开启口及取样杯，再将供试品溶液倒入取样杯中，静置 2 分钟或适当时间脱气，置于取样器上（或将供试品容器直接置于取样器上）。开启搅拌，使溶液混匀（避免气泡产生），每个供试品依法测定至少 3 次，每次取样应不少于 5ml，记录数据，弃每个供试品第一次数据，取后续测定数据的平均值作为测定结果。

3.2.2 标示装量为 25ml 以下的静脉用注射液或注射用浓溶液 除另有规定外，取供试品至少 4 个，分别按下法测定：用水将容器外壁洗净，小心翻转 20 次，使溶液混合均匀，静置 2 分钟或适当时间脱气，小心开启容器，直接将供试品容器置于取样器上，开启搅拌或以手缓缓转动，使溶液混匀（避免产生气泡），由仪器直接抽取适量溶液（以不吸入气泡为限），测定并记录数据；弃第一次测定数据，取后续测定数据的平均值作为测定结果。

注射用浓溶液如黏度太大，不便直接测定时，可经适当稀释，依法测定。

也可采用适宜的方法，在洁净工作台上小心合并至少 4 个供试品的内容物（使总体积不少于 25ml），置于取样杯中，静置 2 分钟或适当时间脱气，置于取样器上。开启搅拌，使溶液混匀（避免气泡产生），依法测定至少 4 次，每次取样应不少于 5ml。弃第一次测定数据，取后续 3 次测定结果的平均值作为测定结果，根据取样体积与每个容器的标示装量体积，计算每个容

器所含的微粒数。

3.2.3 静脉注射用无菌粉末 除另有规定外,取供试品至少4个,分别按下法测定:用水将容器外壁洗净,小心开启瓶盖,精密加入适量微粒检查用水(或适宜的溶剂),小心盖上瓶盖,缓缓振摇使内容物溶解,静置2分钟或适当时间脱气,小心开启容器,直接将供试品容器置于取样器上,开启搅拌或以手缓缓转动,使溶液混匀(避免气泡产生),由仪器直接抽取适量溶液(以不吸入气泡为限),测定并记录数据;弃第一次测定数据,取后续测定结果的平均值作为测定结果。

也可采用适宜的方法,取至少4个供试品,在净化台上用水将容器外壁洗净,小心开启瓶盖,分别精密加入适量微粒检查用水(或适宜的溶剂),缓缓振摇使内容物溶解,小心合并容器中的溶液(使总体积不少于25ml),置于取样杯中,静置2分钟或适当时间脱气,置于取样器上。开启搅拌,使溶液混匀(避免气泡产生),依法测定至少4次,每次取样应不少于5ml。弃第一次测定数据,取后续测定结果的平均值作为测定结果。

3.2.4 供注射用无菌原料药 按品种项下规定,取供试品适量(相当于单个制剂的最大规格量)4份,分别置取样杯或适宜的容器中,照3.2.3法,依法操作并测定。弃第一次测定数据,取后续测定结果的平均值作为测定结果。

3.2.5 血液制品及其他另有规定的生物制品 按照现行版《中国药典》的相关各论要求进行取样和检测。

4 结果报告

4.1 标示装量为100ml或100ml以上的静脉用注射液 除另有规定外,每1ml中含 $10\mu\text{m}$ 及 $10\mu\text{m}$ 以上的微粒不得过25粒,含 $25\mu\text{m}$ 及 $25\mu\text{m}$ 以上的微粒不得过3粒。

4.2 标示装量为100ml以下的静脉用注射液、静脉注射用无菌粉末、注射用浓溶液及供注射用无菌原料 除另有规定外,每个供试品容器(份)中含 $10\mu\text{m}$ 及 $10\mu\text{m}$ 以上的微粒不得过6000粒,含 $25\mu\text{m}$ 及 $25\mu\text{m}$ 以上的微粒不得过600粒。

5 注意事项

在操作过程中应注意避免气泡生成对测定结果造成干扰,摇匀后脱气泡时间不宜过长,防止样品中微粒再次沉降。

起草人:王敏力

复核人:侯继锋

pH 值测定法

1 原理

pH 值是水溶液中氢离子活度的方便表示方法。pH 值定义为水溶液中氢离子活度 (a_{H^+}) 的负对数, 即 $\text{pH} = -\lg a_{\text{H}^+}$, 但氢离子度却难以由实验准确测定。为实用方便, 溶液的 pH 值规定为由下式测定:

$$\text{pH} = \text{pH}_s - \frac{E - E_s}{k}$$

式中 E 为含有待测溶液 (pH) 的原电池电动势, V;

E_s 为含有标准缓冲液 (pH_s) 的原电池电动势, V;

k 为与温度 (t , $^{\circ}\text{C}$) 有关的常数, $k = 0.05916 + 0.000198(t - 25)$ 。

由于待测物的电离常数、介质的介电常数和液接界电位等诸多因素均可影响 pH 值的准确测量, 所以实验测得的数值只是溶液的表现 pH 值, 它不能作为溶液氢离子活度的严格表征。尽管如此, 只要待测溶液与标准缓冲液的组成足够接近, 由上式测得的 pH 值与溶液的真实 pH 值还是颇为接近的。

溶液的 pH 值使用酸度计测定。水溶液的 pH 值通常以玻璃电极为指示电极、饱和甘汞电极或银-氯化银电极为参比电极进行测定。酸度计应定期进行计量检定, 并符合国家有关规定。测定前, 应采用下列标准缓冲液校正仪器, 也可用国家标准物质管理部门发放的标示 pH 值准确至 0.01pH 单位的各种标准缓冲液校正仪器。

2 材料和设备

2.1 材料和试剂 供试品、吸管、适宜容器、仪器校准用标准液。

2.2 仪器设备 pH 测定仪。

3 操作方法

3.1 供试品准备 将供试品从外包装中取出后, 平衡至室温。

3.2 测定方法

3.2.1 接通电源, 打开开关, 使 pH 计呈待用状态。

3.2.2 用纯化水或标准缓冲液清洗电极并用镜头纸吸干。按各生产厂家和不同型号 pH 计使用说明书要求进行仪器自检。

3.2.3 测定前, 依据批准的药品标准中的规定, 选取两种 pH 值约相差 3 个 pH 单位的标准缓冲液, 使供试品的 pH 值处于二者之间, 对 pH 计进行校准。

3.2.4 取与供试品溶液 pH 值较接近的第一种标准缓冲液对仪器进行校正 (定位), 依据仪器说明书进行操作。

3.2.5 再用第二种标准缓冲液核对仪器示值，校正值与标准值之差应不大于 $\pm 0.02\text{pH}$ 单位。若大于此偏差，应按照仪器操作说明进行调节。重复上述定位与调节操作，至仪器示值与标准缓冲液的规定数值相差不大于 0.02pH 单位。否则，不能用于检测。

3.2.6 用纯化水或标准缓冲液清洗电极，用镜头纸吸干。

3.2.7 测定供试品溶液 pH 值：将电极浸入供试品溶液中，待显示屏上显示的数值稳定后记录 pH 值，除另有规定外，重复测定供试品溶液 3 次，取读数平均值为其 pH 值结果。

3.2.8 测量完毕，清洗电极并擦干，放入 3mol/L KCl 溶液中，关闭电源，清场。

4 结果计算

重复测定供试品溶液 3 次，取平均值为其 pH 值结果。

5 结果判定

pH 值结果符合批准的药品标准中的规定，判断为合格，否则即为不合格。

6 注意事项

- 6.1 所用仪器应干燥，并能避免空气中水分的侵入，测定应在干燥处进行。
- 6.2 校准液与供试品应平衡至相同温度进行测定。

起草人：石继春 徐潇

复核人：叶强

渗透压摩尔浓度测定法

1 原理

生物膜，例如人体的细胞膜或毛细血管壁，一般具有半透膜的性质，溶剂通过半透膜由低浓度溶液向高浓度溶液扩散的现象称为渗透，阻止渗透所需要施加的压力，称为渗透压。在涉及溶质的扩散或通过生物膜的液体转运各种生物过程中，渗透压都起着极其重要的作用。因此，在制备注射剂、眼用液体制剂等药物制剂时，必须关注其渗透压。处方中添加了渗透压调节剂的制剂，均应控制其渗透压摩尔浓度。

溶液的渗透压是溶液的依数性之一，通常以渗透压摩尔浓度（Osmolality）来表示，它反映的是溶液中各种溶质对溶液渗透压贡献的总和。

渗透压摩尔浓度的单位，通常以每千克溶剂中溶质的毫渗透压摩尔来表示，可按下列公式计算：

$$\text{毫渗透压摩尔浓度 (mOsmol/kg)} = \frac{\text{每千克溶剂中溶解的溶质克数}}{\text{分子量}} \times n \times 1000$$

式中, n 为一个溶质分子溶解或解离时形成的粒子数。在理想溶液中, 例如葡萄糖 $n=1$, 氯化钠或硫酸镁 $n=2$, 氯化钙 $n=3$, 枸橼酸钠 $n=4$ 。

在生理范围及很稀的溶液中, 其渗透压摩尔浓度与理想状态下的计算值偏差较小; 随着溶液浓度的增加, 与计算值比较, 实际渗透压摩尔浓度下降。例如 0.9% 氯化钠注射液, 按上式计算, 毫渗透压摩尔浓度单位是 mOsmol/kg, 而实际上在此浓度时氯化钠溶液的 n 稍小于 2, 其实际测得值是 286mOsmol/kg; 这是由于在此浓度条件下, 一个氯化钠分子解离所形成的两个离子会发生某种程度的缔合, 使有效离子数减少的缘故。复杂混合物 (如水解蛋白注射液) 的理论渗透压摩尔浓度不容易计算, 因此通常采用实际测定值表示。

在理想的稀溶液中, 冰点下降符合 $\Delta T_f = K_f \cdot m$ 的关系, 式中, ΔT_f 为冰点下降值, K_f 为冰点下降常数 (当水为溶剂时为 1.86), m 为溶液的重量摩尔浓度。而渗透压符合 $P_0 = K_0 \cdot m$ 的关系, 式中, P_0 为渗透压, K_0 为渗透压常数, m 为溶液的重量摩尔浓度。由于两式中的浓度等同, 故通常可以采用测量溶液的冰点下降来间接测定其渗透压摩尔浓度。

2 材料和设备

2.1 试剂 校正用标准溶液: 取基准氯化钠试剂, 于 500~650℃ 干燥 40~50 分钟, 置干燥器 (硅胶) 中冷却至室温。根据需要, 按表 1 中所列数据精密称取适量, 溶于 1kg 水中, 摇匀即得。校正用标准溶液可从中国计量科学研究院购买。

表 1 校正用标准溶液

每 1kg 水中氯化钠的克数	毫渗透压摩尔浓度 / (mOsmol · kg ⁻¹)	冰点下降温度 / (T/℃)
3.087	100	0.186
6.260	200	0.372
9.463	300	0.558
12.684	400	0.744
15.916	500	0.930
19.147	600	1.116
22.380	700	1.302

2.2 材料 管子, 量瓶, 枪头。

2.3 仪器 采用冰点下降的原理设计的渗透压摩尔浓度测定仪通常由制冷系统、用来测定电流或电位差的热敏探头和振荡器 (或金属探针) 组成。测定时将测定探头浸入供试溶液的中心, 并降至仪器的冷却槽中。启动制冷系统, 当供试溶液的温度降至凝固点以下时, 仪器采用振荡器 (或金属探针) 诱导溶液结冰, 自动记录冰点下降的温度。仪器显示的测定值可以是冰点下降的温度, 也可以是渗透压摩尔浓度。

根据渗透压摩尔浓度测定仪检定规程 (JJG1089-2013), 示值误差在浓度不大于 400mOsmol/kg 时, 不超过 ±6mOsmol/kg; 浓度大于 400mOsmol/kg 时, 不超过 ±1.5%。两次测定值的相对标准偏差不得超过 2%。渗透压摩尔浓度测定仪的检定周期一般不超过 1 年。

3 操作方法

3.1 供试品溶液的制备 供试品如为液体，通常可直接测定；如为固体（如注射用无菌粉末），可采用药品标签或说明书中的规定溶剂溶解并稀释至表 1 测定范围内。

3.2 渗透压摩尔浓度测定 按仪器说明书操作，首先取适量新沸放冷的水调节仪器零点，然后由表 1 中选择两种标准溶液（供试品溶液的渗透压摩尔浓度应介于两者之间）校正仪器，再测定供试品溶液的渗透压摩尔浓度或冰点下降值。每份供试品重复测量 3 次，计算 3 次检测平均值。

4 记录

记录一般应包括所用仪器型号、标准溶液的制备、供试品溶液的制备（直接测定或稀释后测定）、两种标准溶液的校准结果、供试品溶液测定结果，数据处理器打印出相应的数据等。

5 注意事项

5.1 供试品溶液的渗透压摩尔浓度应介于两者之间。

5.2 为了使测定结果准确并有良好的重现性，应按各仪器说明书规定的取样体积，准确取样至测定管中，同时应避免测定溶液中存在气泡。

5.3 供试品溶液再次测定时，需重新取样至另一干净的测定管中，测定后的溶液不得重复使用，因为降至冰点再融化的溶液，溶质可能已不是均匀分布于溶剂中，易导致过早结晶，影响测定结果的重现性。

起草人：卞莲莲

复核人：胡忠玉 梁争论

氯化钠测定法

1 原理

本法系用硝酸破坏供试品中的蛋白质后，再加入过量的硝酸银，使供试品中的氯离子与硝酸银完全反应，生成氯化银沉淀析出，过量的硝酸银用硫氰酸铵滴定液滴定，根据硫氰酸铵滴定液消耗的量，可计算出供试品中氯化钠的含量。

2 材料和设备

2.1 试剂 供试品，硝酸银溶液，硝酸溶液，蒸馏水，硫酸铁铵指示液，硫氰酸铵滴定液。

2.2 溶液

2.2.1 0.1mol/L 硝酸银溶液：称取硝酸银 17.0g，水溶解并稀释至 1000ml。

2.2.2 0.1mol/L 硫氰酸铵滴定液的制备及滴定：称取硫氰酸铵 8.0g，加水溶解并稀释至 1000ml，摇匀。精密量取硝酸银滴定液（0.1mol/L）25ml，加水 50ml、硝酸 2ml 与 8%硫酸铁铵指示液 2ml，用本液滴定至溶液微显淡棕红色；经剧烈振摇后仍不褪色，即为终点。根据本液的消耗量算出本液的浓度。平行滴定至少 4 次，计算平均值，4 次平行标定的极差应小于 0.00040mol/L。

2.2.3 0.05mol/L 硫氢酸铵滴定液：精密量取 0.1mol/L 硫氰酸铵滴定液 100ml，加水稀释至 200ml，摇匀。

2.2.4 实验用水：至少应符合 GB/T6682 中三级水的规格。

2.3 材料 量筒、滴定管。

2.4 设备 天平、电磁炉。

3 操作方法

精密量取供试品 1.0ml，精密加入 0.1mol/L 硝酸银溶液 5ml，混匀，加 8.0mol/L 硝酸溶液 10ml，加热消化至溶液澄清，冷却，加水 50ml 和 8%硫酸铁铵指示液 1ml，用 0.05mol/L 硫氰酸铵滴定液滴定，滴定速度一般应保持在 6~8ml/min，滴定至溶液呈淡棕红色，振摇后仍不褪色，即为滴定终点。空白对照试验是精确吸取 1.0ml 蒸馏水作为空白，不进行消化，加水 50ml 和 8%硫酸铁铵指示液 1ml，用 0.05mol/L 硫氰酸铵滴定液滴定至溶液呈淡棕红色，振摇后仍不褪色，即为空白对照试验的滴定终点。

4 计算

$$\text{氯化钠含量 (g/L)} = (V_0 - V_x) \times C \times 58.44$$

式中 V_0 为空白对照消耗硫氰酸铵滴定液的体积，ml； V_x 为供试品消耗硫氰酸铵滴定液的体积，ml； C 为硫氰酸铵滴定液浓度，mol/L；58.44 为氯化钠的分子量。

5 结果与判定

将计算获得供试品氯化钠含量与经批准的产品质量标准进行比较，若符合产品质量标准中氯化钠含量要求，则判定为合格。

6 注意事项

6.1 正确选择滴定管 硫氰酸铵滴定液显微酸性，应选择酸式滴定管，并根据滴定液的使用量选择合适量程的滴定管。

6.2 正确使用滴定管

6.2.1 酸式滴定管的玻璃活塞是固定配合该滴定管的，所以不能任意更换。要注意玻璃塞是否旋转自如，通常是取出活塞，拭干，在活塞两端沿圆周抹一薄层凡士林作润滑剂（或真空活塞油脂），然后将活塞插入，顶紧，旋转几下使凡士林分布均匀（几乎透明）即可，再在活塞尾端套一橡皮圈，使之固定。注意凡士林不要涂得太多，否则易使活塞中的小孔或滴定管下端管尖堵塞。在使用前应试漏。

6.2.2 使用酸式滴定管时，应将滴定管固定在滴定管夹上，活塞柄向右，左手从中间向右

伸出，拇指在管前，食指及中指在管后，三指平行地轻轻握住活塞柄，无名指及小指向手心弯曲，食指及中指由下向上顶住活塞柄一端，拇指在上面配合动作。在转动时，中指及食指不要伸直，应该微微弯曲，轻轻向左扣住，这样既容易操作，又可防止把活塞顶出。

6.2.3 滴定管在使用前需要用待装溶液预洗 2~3 次，滴定管装满后，需要除去管内气泡，每次滴定时，需从滴定管 0.00 位置开始。

6.3 滴定过程注意流速，滴定速度一般应保持在 6~8ml/min，滴定快到终点时，一定要逐滴或者半滴进行滴定，减少滴定误差。

6.4 摇瓶时应按照一个方向匀速摇动，滴定瓶不得接触滴定管。

6.5 滴定管正确读数 对于无色或浅色溶液，读数时眼睛的视线和滴定管内溶液凹液面的最低点保持水平；对于有色溶液，读数时眼睛的视线和滴定管内溶液面两侧的最高点呈水平；滴定开始和结束后，需要等待 1~2 分钟，使附着在内壁上的溶液流下来后才能读数，马上读数会造成体积误差。

为了协助读数，可在滴定管后面衬一“读数卡”（涂有一黑长方形的约 4cm×1.5cm 白纸）或用一张黑纸绕滴定管一圈，拉紧，置液面下刻度 1 分格（0.1ml）处使纸的上缘前后在一水平上；此时，由于反射完全消失，弯月面的液面呈黑色，明显的露出来，读此黑色弯月面下缘最低点。滴定液颜色深而需读两侧最高点时，就可用白纸为“读数卡”。若所用白背蓝线滴定管，其弯月面能使色条变形而成两个相遇一点的尖点，可直接读取尖头所在处的刻度。

6.6 标准滴定液的保存 滴定液在配制后应按药典规定的保存条件进行保存，一般宜采用质量较好的具玻璃塞玻璃瓶。硫氰酸铵滴定液保存效期为 1 个月，应每月进行重新标定。

起草人：杨英超

复核人：马霄

氢氧化铝测定法

1 原理

本法采用的是返滴定法，即先准确地加入一定量过量的标准溶液，使其与试液中的被测物质进行反应，待反应完成后，再用另一种标准溶液滴定剩余的标准溶液。其基本原理是先加入已知过量的乙二胺四乙酸二钠（EDTA）标准溶液，待铝离子与 EDTA 反应完成后，再用锌滴定液滴定剩余的乙二胺四乙酸二钠，根据锌滴定液的消耗量，可计算出供试品中氢氧化铝的含量。

2 材料和设备

2.1 溶液和试剂 供试品、磷酸溶液、乙二胺四乙酸二钠滴定液、醋酸-醋酸铵缓冲液、冰乙酸（分析纯）、二甲酚橙指示剂、锌滴定液。

2.1.1 乙酸-醋酸铵缓冲液（pH 4.5）：称取醋酸铵 7.7g，加水 50ml 溶解后，加冰乙酸 6ml，加水稀释至 100ml。

2.1.2 0.05mol/L 锌滴定液的制备与滴定：称取硫酸锌 15g（相当于锌约 3.3g），加稀盐酸（23.4→100）10ml，适量水溶解并稀释至 1000ml，摇匀。精密量取本液 25ml，加 0.025%甲基红的乙醇溶液 1 滴，滴加氨试剂至溶液显微黄色，加水 25ml、氨-氯化铵缓冲液（pH 10.0）10ml 与铬黑 T 指示剂少量，用乙二胺四乙酸二钠滴定液（0.05mol/L）滴定至溶液由紫色变为纯蓝色，并将滴定的结果用空白试验校正。根据乙二胺四乙酸二钠滴定液（0.05mol/L）的消耗量，算出本液的浓度，即得。

2.1.3 0.025mol/L 锌滴定液的制备：精密量取锌滴定液（0.05mol/L）100ml，加水准确稀释至 200ml，摇匀，即得。

2.1.4 0.05mol/L 乙二胺四乙酸二钠滴定液的制备与滴定：称取乙二胺四乙酸二钠 19g，加适量的水溶解并稀释至 1000ml，摇匀。取大约 800℃灼热至恒重的标准氧化锌 0.12g，精密称取，加稀盐酸（23.4→100）3ml 使溶解，加水 25ml，加 0.025%甲基红的乙醇溶液 1 滴，滴加氨试剂至溶液显微黄色，加水 25ml 与氨-氯化铵缓冲液（pH 10.0）10ml，再加铬黑 T 指示剂少量，用本液滴定至溶液由紫色变为纯蓝色，并将滴定的结果用空白试验校正。每 1ml 乙二胺四乙酸二钠滴定液（0.05mol/L）相当于 4.069mg 的氧化锌。根据本液的消耗量与氧化锌的取用量，算出本液的浓度，即得。

2.1.5 实验用水：至少应符合 GB/T 6682 中三级水的规格。

2.2 材料 量筒、锥形瓶、滴定管。

2.3 设备 天平、水浴锅。

3 操作方法

精密量取供试品，置 250ml 锥形瓶中，加 6%磷酸溶液 1.5ml，使完全溶解，必要时于水浴中加温。精密加入 0.05mol/L 乙二胺四乙酸二钠滴定液 10ml，乙酸-醋酸铵缓冲液 10ml，置沸水浴上加热 10 分钟，取出冷至室温，加浓度为 0.1%的二甲酚橙指示剂 1ml，用 0.025mol/L 锌滴定液进行滴定，滴定速度一般应保持在 6~8ml/min，当溶液由亮黄色转变为橙色，即为终点，并将滴定的结果用空白试验校正。

4 计算

$$\text{氢氧化铝含量 (mg/ml)} = \frac{(\text{空白滴定数} - \text{供试品滴定数}) \times \text{标准锌液浓度 (mol/L)} \times 78.01}{\text{供试品体积 (ml)}}$$

78.01 为氢氧化铝的分子量或相对原子质量。

5 结果与判定

将计算获得的供试品氢氧化铝含量与经批准的产品质量标准进行比较，若符合产品质量标

准中氢氧化铝含量要求，则判定为合格。

6 注意事项

6.1 正确选择滴定管 锌滴定液呈酸性，应选择酸式滴定管，并根据滴定液的使用量选择合适量程的滴定管。

6.2 正确使用滴定管

6.2.1 酸式滴定管的玻璃活塞是固定配合该滴定管的，所以不能任意更换。要注意玻璃是否旋转自如，通常是取出活塞，拭干，在活塞两端沿圆周抹一薄层凡士林作润滑剂（或真空活塞油脂），然后将活塞插入，顶紧，旋转几下使凡士林分布均匀（几乎透明）即可，再在活塞尾端套一橡皮圈，使之固定。注意凡士林不要涂得太多，否则易使活塞中的小孔或滴定管下端管尖堵塞。在使用前应试漏。

6.2.2 使用酸式滴定管时，应将滴定管固定在滴定管夹上，活塞柄向右，左手从中间向右伸出，拇指在管前，食指及中指在管后，三指平行地轻轻握住活塞柄，无名指及小指向手心弯曲，食指及中指由下向上顶住活塞柄一端，拇指在上面配合动作。在转动时，中指及食指不要伸直，应该微微弯曲，轻轻向左扣住，这样既容易操作，又可防止把活塞顶出。

6.2.3 滴定管在使用前需要用待装溶液预洗 2~3 次，滴定管装满后，需要除去管内气泡，每次滴定时，需从滴定管 0.00 位置开始。

6.3 滴定过程注意流速，滴定速度一般应保持在 6~8ml/min，滴定快到终点时，一定要逐滴或者半滴进行滴定，减少滴定误差。

6.4 摇瓶时应按照一个方向匀速摇动，滴定瓶不得接触滴定管。

6.5 滴定管正确读数 对于无色或浅色溶液，读数时眼睛的视线和滴定管内溶液凹液面的最低点保持水平；对于有色溶液，读数时眼睛的视线和滴定管内溶液面两侧的最高点呈水平；滴定开始和结束后，需要等待 1~2 分钟，使附着在内壁上的溶液流下来后才能读数，马上读数会造成体积误差。

为了协助读数，可在滴定管后面衬一“读数卡”（涂有一黑长方形的约 4cm×1.5cm 白纸）或用一张黑纸绕滴定管一圈，拉紧，置液面下刻度 1 分格（0.1ml）处使纸的上缘前后在一水平上；此时，由于反射完全消失，弯月面的液面呈黑色，明显的露出来，读此黑色弯月面下缘最低点。滴定液颜色深而需读两侧最高点时，就可用白纸为“读数卡”。若所用白背蓝线滴定管，其弯月面能使色条变形而成两个相遇一点的尖点，可直接读取尖头所在处的刻度。

6.6 标准滴定液的保存 锌滴定液在配制后应按药典规定的保存条件进行保存，一般宜采用质量较好的具玻璃塞的棕色瓶中避光保存。锌滴定液中 ZnY 络合物在酸性条件下不稳定，而在碱性条件下稳定，故可滴加氨试液调溶液 pH 呈碱性。保存效期为 3 个月，过期应重新标定。

起草人：杨英超

复核人：马霄

硫柳汞测定法

1 原理

本法系依据汞有机化合物经强酸消化成无机汞离子，与双硫脲溶液形成橙黄色化合物，根据双硫脲滴定液的消耗量，可计算出供试品中硫柳汞含量。

2 材料和设备

2.1 溶液和试剂 供试品、双硫脲滴定液、汞溶液、三氯甲烷、四氯化碳、氯化高汞、硫酸、盐酸羟胺溶液。

2.1.1 双硫脲滴定液：精密称取双硫脲 50mg，置 100ml 量瓶中，加三氯甲烷溶解并稀释至刻度，摇匀，作为贮备液。

临用前，精密量取贮备液 2.5ml，置 100ml 量瓶中，加四氯化碳稀释至刻度，摇匀，即得双硫脲滴定液，保存于冷暗处。

2.1.2 标准汞溶液：取置硫酸干燥器中干燥至恒重的氯化高汞约 0.135g，精密称定，置 100ml 量瓶中，加 0.5mol/L 硫酸溶解并稀释至刻度，摇匀，即为标准汞贮存液。

临用前，精密量取标准汞贮备液适量，置 100ml 量瓶中，加 0.5mol/L 硫酸溶液稀释至刻度，摇匀，即为每 1ml 相当于 50 μ g Hg 的标准汞溶液。

2.2 材料 量筒、滴定管。

2.3 设备 天平、干燥器、电磁炉。

3 操作方法

3.1 消化 精密量取供试品适量（约相当于含汞量 50 μ g），置 150ml 圆底磨口烧瓶（附长 40cm 回流管）中，加硫酸 2ml、8.0mol/L 硝酸溶液 0.5ml 混匀后，置电炉上加热回流 15 分钟（或置于 3cm \times 24cm 试管中，加盖置 85~90 $^{\circ}$ C 水浴加热 1 小时），冷却后加水 40ml，加 20% 盐酸羟胺溶液 5ml。

3.2 供试品滴定 用水 40ml 将上述消化后溶液分数次冲洗入 125ml 分液漏斗中，用双硫脲滴定液滴定，开始时每次可加入 2ml 左右，以后逐渐减少至每次 0.5ml，最后还可少至 0.2ml。每次加入滴定液后，振摇 10 分钟，静置分层，弃去四氯化碳层，继续滴定，直至双硫脲液的颜色不变，即为终点。

3.3 标准汞溶液滴定 精密量取标准汞溶液 1ml，置 125ml 分液漏斗中，加硫酸 2ml，加水 80ml 和 20% 盐酸羟胺溶液 5ml，后续步骤与 3.2 滴定中“用双硫脲滴定液滴定”同法操作。

4 计算

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

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

5 结果与判定

将计算获得的供试品硫柳汞含量与经批准的产品质量标准进行比较, 若符合产品质量标准中硫柳汞含量要求, 则判定为合格。

6 注意事项

6.1 正确选择滴定管 本法选择酸式滴定管, 并根据滴定液的使用量选择合适量程的滴定管。

6.2 正确使用滴定管

6.2.1 酸式滴定管的玻璃活塞是固定配合该滴定管的, 所以不能任意更换。要注意玻塞是否旋转自如, 通常是取出活塞, 拭干, 在活塞两端沿圆周抹一薄层凡士林作润滑剂 (或真空活塞油脂), 然后将活塞插入, 顶紧, 旋转几下使凡士林分布均匀 (几乎透明) 即可, 再在活塞尾部套一橡皮圈, 使之固定。注意凡士林不要涂得太多, 否则易使活塞中的小孔或滴定管下端管尖堵塞。在使用前应试漏。

6.2.2 使用酸式滴定管时, 应将滴定管固定在滴定管夹上, 活塞柄向右, 左手从中间向右伸出, 拇指在管前, 食指及中指在管后, 三指平行地轻轻握住活塞柄, 无名指及小指向手心弯曲, 食指及中指由下向上顶住活塞柄一端, 拇指在上面配合动作。在转动时, 中指及食指不要伸直, 应该微微弯曲, 轻轻向左扣住, 这样既容易操作, 又可防止把活塞顶出。

6.2.3 滴定管在使用前需要用待装溶液预洗 2~3 次, 滴定管装满后, 需要除去管内气泡, 每次滴定时, 需从滴定管 0.00 位置开始。

6.3 双硫脲滴定操作与滴定结果有直接的关系, 足够的振摇幅度、频率、时间才能保证双硫脲与二价汞离子反应完全。滴定快到终点时, 一定要逐滴或者半滴进行滴定, 减少滴定误差。

6.4 摇瓶时应按照一个方向匀速摇动, 滴定瓶不得接触滴定管。

6.5 滴定管正确读数 对于无色或浅色溶液, 读数时眼睛的视线和滴定管内溶液凹液面的最低点保持水平; 对于有色溶液, 读数时眼睛的视线和滴定管内溶液液面两侧的最高点呈水平; 滴定开始和结束后, 需要等待 1~2 分钟, 使附着在内壁上的溶液流下来后才能读数, 马上读数会造成体积误差。

为了协助读数, 可在滴定管后面衬一“读数卡” (涂有一黑长方形的约 4cm×1.5cm 白纸) 或用一张黑纸绕滴定管一圈, 拉紧, 置液面下刻度 1 分格 (0.1ml) 处使纸的上缘前后在一水平上; 此时, 由于反射完全消失, 弯月面的液面呈黑色, 明显的露出来, 读此黑色弯月面下缘最低点。滴定液颜色深而需读两侧最高点时, 就可用白纸为“读数卡”。若所用

白背蓝线滴定管，其弯月面能使色条变形而成两个相遇一点的尖点，可直接读取尖头所在处的刻度。

6.6 标准滴定液的保存 双硫脲滴定液在配制后对光、空气、高温均不稳定，应按药典规定的保存条件进行保存，一般宜采用质量较好的具玻璃塞的棕色瓶避光保存。

6.7 消化回流时间对消化程度有较大影响，需要严格控制。

起草人：杨英超

复核人：马霄

苯酚测定法（滴定法）

1 原理

采用溴量法限度试验检测苯酚含量，原理系根据溴酸盐溶液与盐酸反应产生溴，溴遇苯酚产生三溴苯酚，过量的溴与碘化钾反应释出碘，析出的碘用硫代硫酸钠滴定液滴定，根据硫代硫酸钠滴定液的消耗量，可计算出供试品中苯酚的含量。

2 材料

2.1 溶液和试剂 25%碘化钾溶液、0.02mol/L 溴液、6mol/L 盐酸溶液、标准硫代硫酸钠溶液（0.02mol/L）、淀粉指示液。

2.2 材料 200ml 碘瓶、具塞锥形瓶、碱式滴定管、量筒等。

3 操作方法

取供试品 1.0ml 于碘瓶，加蒸馏水 50ml，加 0.02mol/L 溴液 15ml，沿瓶壁加 6mol/L 盐酸 10ml，摇匀，密塞。置暗处 30 分钟后，加 25% 碘化钾溶液 2ml，以少量蒸馏水洗瓶口，用 0.02mol/L 硫代硫酸钠滴定至溶液呈浅黄色。加 0.5ml 淀粉指示液，继续滴定至蓝色消失。同时用蒸馏水做空白对照。

4 结果计算

批号	滴定体积 (ml)	苯酚含量 (g/L)
空白对照		/
供试品批号		

$$\text{苯酚含量 (g/L)} = (\text{空白滴定体积} - \text{供试品滴定体积}) \times \text{硫代硫酸钠浓度 (mol/L)} \times 15.69 \text{ (g/L)}$$
$$\text{苯酚含量 (\%)} = (\text{空白滴定体积} - \text{供试品滴定体积}) \times \text{硫代硫酸钠浓度 (mol/L)} \times 15.69 \times 100 / 1000 \text{ (\%)}$$

式中, 15.69 为苯酚分子量的 1/6, 体积单位为 ml。

5 结果与判定

应符合标准规定。

6 注意事项

实验中应注意滴定终点的判断, 溶液蓝色消失且 30 秒内不变色。

起草人: 鲁旭

复核人: 王斌

蛋白质含量测定法

在进行蛋白质含量测定时, 可根据情况选择下列一种方法进行测定。

第一法: 半微量定氮法

1 原理

本法系依据蛋白质为含氮的有机化合物, 当与硫酸和硫酸铜、硫酸钾一同加热消化时使蛋白质分解, 分解的氨与硫酸结合生成硫酸铵。然后碱化蒸馏使氨游离, 用硼酸液吸收后以硫酸滴定液滴定, 根据酸的消耗量算出含氮量, 再将含氮量乘以换算系数, 即为蛋白质的含量。

2 材料和设备

2.1 试剂和溶液

2.1.1 硫酸: 分析纯, 比重 1.84。

2.1.2 消化剂: FOSS 催化剂片 (4.5g K_2SO_4 , 0.5g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)

2.1.3 0.05mol/L H_2SO_4 标准液。

2.1.4 40%氢氧化钠: 取 NaOH (分析纯) 1000g, 加蒸馏水 2500ml, 混匀。

2.1.5 指示剂: 0.1%溴甲酚绿 (100mg 溴甲酚绿溶于 100ml 95%乙醇溶液)。0.1%甲基红溶液 (100mg 甲基红溶于 100ml 95%乙醇溶液)。可用超声水浴促进溶解。

2.1.6 硼酸吸收液：1%硼酸溶液（硼酸 25.0g，加 2500ml 蒸馏水溶解。加入 17.5ml 0.1% 甲基红溶液和 25ml 0.1% 溴甲酚绿，混匀）。

2.1.7 10%钨酸钠液：取钨酸钠 10g，加蒸馏水使之溶解成 100ml。

2.1.8 0.33mol/L H_2SO_4 ：取分析纯 H_2SO_4 1.86ml，缓缓注入至适量的蒸馏水中，待冷却后再加水稀释至 100ml。

2.1.9 10%三氯醋酸：取三氯醋酸 10g，加蒸馏水使之溶解成 100ml。

2.2 设备 消化炉，定氮仪。

3 操作方法

3.1 准确量取一定体积供试品（含氮量 8~40mg 左右）于凯氏定氮管中，加催化剂，浓硫酸，在消化炉上加热至澄明蓝绿色，同时作空白。

3.2 精确量取供试品 2ml 于合适的试管中，加蒸馏水 14ml，10%钨酸钠 2ml，0.33mol/L H_2SO_4 2ml，混匀，静置 30 分钟后，过滤至试管中，滤液应清亮，如混浊应反复过滤至清亮，取一定体积澄清滤液于定氮管中进行消化。

3.3 或精确量取适宜体积供试品（蛋白质含量 6~12mg）于合适的试管中，加等体积的 10%三氯醋酸，混匀，静置 30 分钟后，滤过，弃去初滤液，取一定体积续滤液至凯氏定氮管进行消化。

3.4 蒸馏与滴定：使用定氮仪根据设置的程序进行测定总氮含量。

4 计算

供试品总氮量（mg/ml）：定氮仪读取测定数据。

供试品非蛋白氮量（mg/ml）：定氮仪读取测定数据。

$$\text{供试品蛋白含量 (g/L)} = (\text{总氮量} - \text{非蛋白氮量}) \times 6.25$$

5 注意事项

5.1 仪器使用注意事项：各种试剂桶和滴定缸有警示液面。实验前要用空管进行空蒸，使机器处于良好的蒸馏状态，空蒸数据相差不大再进行样品测定。实验后要对机器进行清洗程序，使仪器保持清洁。关机后要对仪器行程清洁处理。

5.2 每次试验，应同时做质控品，保证质控品结果成立。

5.3 本法为半微量法，若室内空气不清洁将影响最终试验结果，因此，定氮实验室最好专用，且保持室内空气清洁流通。干扰物质：各种挥发性酸类物质（HCl， HNO_3 等）；大量 CO_2 ；一切成酸或成碱性气体。

5.4 若初试结果不合格，复试 1 次，以两次结果的均值判定。

5.5 总氮与非蛋白氮可用同一空白。

起草人：周倩

复核人：侯继锋 王菁舟

第二法：Lowry 法

1 原理

蛋白质分子中含有的肽键在碱性溶液中与 Cu^{2+} 螯合形成蛋白质-铜复合物，此复合物使酚试剂的磷钼酸还原，产生蓝色化合物，同时在碱性条件下酚试剂易被蛋白质中酪氨酸、色氨酸、半胱氨酸还原呈蓝色反应。在一定范围内其颜色深浅与蛋白质浓度成正比，以蛋白质对照品溶液做标准曲线，采用比色法测定供试品中蛋白质的含量。

本法灵敏度高，测定范围为 $20\sim 250\mu\text{g}$ 。但对本法产生干扰的物质较多，对双缩脲反应产生干扰的离子，同样容易干扰福林酚反应，且影响更大。如还原物质、酚类、枸橼酸、硫酸铵、三羟甲基氨基甲烷缓冲液、甘氨酸、糖类、甘油等均有干扰作用。可以通过脱氧胆酸盐-三氯醋酸将蛋白质沉淀，以去除干扰物质。

本实验方法 1 为常规方法，如有干扰物质，可按方法 2 操作。

方法 1

2 材料和设备

2.1 材料

2.1.1 碱性铜溶液：取氢氧化钠 10g，碳酸钠 50g，加水 400ml 使溶解，作为甲液；取酒石酸钾 0.5g，加水 50ml 使溶解，另取硫酸铜 0.25g，加水 30ml 使溶解，将两液混合作为乙液。临用前，合并甲、乙液，并加水至 500ml。

2.1.2 福林酚试液：取 2mol/L 福林酚储备液使用去离子水进行 16 倍稀释。

2.1.3 蛋白质含量检定用国家标准品。

2.2 仪器 紫外可见分光光度计。

3 操作方法

3.1 标准品和供试品溶液的制备 取蛋白质标准品稀释为 0.2mg/ml 溶液，精密量取标准品溶液 0.0ml, 0.2ml, 0.4ml, 0.6ml, 0.8ml, 1.0ml 至具塞试管中，加去离子水至 1.0ml。供试品进行适当稀释，精密量取 1.0ml 至具塞试管中。

3.2 处理与检测 标准品与供试品各管分别加入碱性铜试液 1.0ml，涡旋混匀后室温放置 10 分钟。各加入福林酚试液 4.0ml，立即涡旋混匀，室温放置 30 分钟。

3.3 吸光度检测 以浓度为 0 标准品管为空白对照，在 650nm 波长测定吸光度。

4 结果计算

以蛋白质标准品溶液的吸光度值与其对应浓度做直线回归。将供试品吸光度值代入标准曲线求出对应的浓度，乘以稀释倍数后即为供试品蛋白质浓度。

方法 2

2 材料和设备

2.1 材料

2.1.1 试液 A: 取 1% 氢氧化钠和 5% 碳酸钠各 200ml, 加去离子水至 500ml。

2.1.2 试液 B: 取 2.98% 二水合酒石酸二钠和 1.25% 硫酸铜溶液各 100ml, 加去离子水至 250ml, 临用前配制。

2.1.3 试液 C: 按 50:1 比例将试剂 A 和试剂 B 混合, 临用前配制。

2.1.4 福林酚试液: 取 2mol/L 福林酚储备液使用去离子水进行 2 倍稀释。

2.1.5 脱氧胆酸钠溶液: 使用去离子水溶解为 1.5g/L 溶液。

2.1.6 蛋白质含量检定用国家标准品 (以下简称蛋白质标准品)。

2.2 仪器 紫外可见分光光度计。

3 操作方法

3.1 标准品和供试品稀释 取蛋白质标准品稀释为 0.05mg/ml 溶液, 精密量取标准品溶液 0.0ml, 0.2ml, 0.4ml, 0.6ml, 0.8ml, 1.0ml 至具塞试管中, 加去离子水至 1.0ml。供试品进行适当稀释, 精密量取 1.0ml 至具塞试管中。

3.2 处理与检测 加入脱氧胆酸钠溶液 0.1ml, 涡旋混匀后室温放置 10 分钟。加入 72% 三氯醋酸溶液 0.1ml, 涡旋混匀后 3000g 离心 30min, 吸弃上清液。蛋白质沉淀使用 6ml 试液 C 涡旋溶解, 室温放置 10 分钟。加入福林酚试液 0.5ml, 立即涡旋混匀, 室温放置 30 分钟。

3.3 吸光度检测 以浓度为 0 标准品管为空白对照, 在 750nm 波长测定吸光度。

4 结果计算

以蛋白质标准品溶液的吸光度值与其对应浓度做直线回归。将供试品吸光度值代入标准曲线求出对应的浓度, 乘以稀释倍数后即为供试品蛋白浓度。

起草人: 徐康维

复核人: 李长贵

第三法: 二辛可宁酸法 (BCA 法)

1 原理

本法是利用基于二辛可宁酸 (bicinchoninic acid, BCA) 的配伍检测试剂, 用于总蛋白的比色检测和定量。蛋白质在碱性溶液中通过缩二脲反应将 Cu^{2+} 转换为亚铜离子 Cu^+ , 1 个 Cu^+ 与 2 个 BCA 分子螯合, 形成可在 562nm 处表现出较强吸光度的紫色水溶性复合物, 在较宽的蛋白浓度范围内, 吸光度值与蛋白质浓度的增加成线性关系。

2 材料和设备

2.1 牛血清白蛋白 (BSA) 标准品 用于标准工作曲线的制备, 可按企业或检测机构要求

选用符合检测要求的标准物质。

2.2 BCA 蛋白含量分析试剂 依据现行版《中国药典》要求配制或使用商品化检测试剂。

2.3 PBS 缓冲液 pH 为 7.0~7.4 的 0.01mol/L 磷酸盐缓冲液。

2.4 耗材及设备 检测或反应容器可为玻璃管、EP 管或透明 96 孔板。检测设备为经过计量的紫外分光光度计或酶标仪。

3 操作方法

3.1 取出 BSA 标准品及检测试剂，室温平衡 30 分钟，记录标准品及检测试剂批号及有效期。

3.2 BSA 标准品溶液制备 取牛血清蛋白 (BSA) 标准品，根据检测试剂说明书及供试品的预估蛋白浓度确定 BSA 标准工作曲线的范围，用 PBS 缓冲液或水分别稀释获取工作曲线。当工作曲线范围为 25~2000 $\mu\text{g/ml}$ 时，建议标准蛋白浓度配制点包括 0 $\mu\text{g/ml}$ ，25 $\mu\text{g/ml}$ ，125 $\mu\text{g/ml}$ ，250 $\mu\text{g/ml}$ ，500 $\mu\text{g/ml}$ ，750 $\mu\text{g/ml}$ ，1000 $\mu\text{g/ml}$ ，1500 $\mu\text{g/ml}$ ，2000 $\mu\text{g/ml}$ ；当工作曲线范围为 5~250 $\mu\text{g/ml}$ 时，建议标准蛋白浓度配制点包括 0 $\mu\text{g/ml}$ ，5 $\mu\text{g/ml}$ ，25 $\mu\text{g/ml}$ ，50 $\mu\text{g/ml}$ ，125 $\mu\text{g/ml}$ ，250 $\mu\text{g/ml}$ ；也可按照试剂盒建议配制 BSA 系列工作曲线。

3.3 供试品溶液制备 用 PBS 缓冲液或水将供试品稀释至蛋白浓度落在 BSA 标准工作曲线线性范围内。

3.4 BCA 工作液制备 依据现行版《中国药典》或说明书要求准备。

3.5 加样 按检测试剂说明书建议比例，先将空白对照 (PBS 缓冲液)、供试品溶液及上述各稀释梯度的 BSA 标准品溶液加入玻璃管 (或 EP 管，或 96 孔透明细胞培养板)，再加入 BCA 工作液，充分混匀。每个样品均复孔加样。按照说明书要求放入恒温箱或室温孵育一定时间后，在 10 分钟内读取 562nm 吸光度值。

3.6 蛋白定量 以系列蛋白标准品浓度 ($\mu\text{g/ml}$) 对吸光度值绘制标准曲线，得出线性回归方程，线性相关系数 r 值应符合实验室要求。将供试品的吸光度值代入线性方程计算蛋白浓度，根据稀释倍数得到供试品蛋白浓度 ($\mu\text{g/ml}$)。

4 注意事项

4.1 BCA 法为非终点方法，即反应开始后颜色一直处在缓慢变化过程中，因此需在尽可能短的时间内完成检测，建议在孵育反应完成后 10 分钟内检测。

4.2 为保证检测结果的重复性，需要固定各次实验所使用的容器 (玻璃管、EP 管或 96 孔板)，孵育时间和检测时间。

4.3 初次使用某一品牌和货号的试剂盒时，建议通过加标回收法验证试剂盒的定量准确性。

4.4 蛋白质浓度的定量需参照一种普通蛋白质的标准，如 BSA。如果需要精确定量未知的蛋白质，可选择相同的蛋白质。

4.5 本方法不适合含螯合剂蛋白质样品的检测。

起草人：吴星 高帆 卞莲莲

复核人：梁争论

水分测定法

在进行水分测定时，可根据情况选择下列一种方法进行测定。

方法一：费休氏法

1 原理

本方法是利用碘在吡啶和甲醇溶液中氧化二氧化硫时需要定量的水参加反应的原理来测定样品中的水分含量。

2 材料和设备

- 2.1 材料和试剂 供试品、吸管、称量瓶、药勺、费休氏试液。
- 2.2 仪器设备 烤箱（50~300℃）、水分测定仪、去湿机、湿度计。

3 操作方法

3.1 实验准备和环境要求 电解槽及电极、称量瓶和药勺清洗干净，70~80℃烤箱干燥2小时以上，室温18~28℃之间，室内湿度不超过50%。

3.2 测定过程 先将系统中的水分预滴定除去，而后精密量取适量供试品，迅速转移至阳极电解液中，用卡尔-费休库伦滴定仪直接测定。从仪器显示屏上直接读取供试品中水分的含量（μg）。

4 结果计算

$$\text{水分}(\%) = \text{水分重}(\mu\text{g}) \div \text{样品重}(\text{g}) \div 10^6 \times 100\%$$

每批样品测定两次，取平均值为最终结果。

如使用型号为METTLER TOLEDO DL39型的水分测定仪，则采用下列公式计算：

$$\text{水分}(\%) = \frac{\text{水分检出量}(\mu\text{g}) - [(\text{检测时间}(\text{s}) \times \text{DRIFT 值}/60) + \text{空白值}]}{10^6 \times \text{称重质量}(\text{g})} \times 100\%$$

5 结果判定

两份测定供试品的结果均应在规定限度内。

6 注意事项

所用仪器应干燥，并能避免空气中水分的侵入，测定应在干燥处进行。

方法二：真空干燥法

1 原理

本方法是通过干燥后供试品所减失重量的百分率，计算供试品水分含量。

2 材料和设备

电子天平、真空干燥箱，称量瓶。

3 操作方法

3.1 取供试品 0.2~1.0g 置于已干燥至恒重的称量瓶中，加盖，精密称定重量。

3.2 将称量瓶放入真空干燥箱中，打开瓶盖，于 60℃ 将干燥器抽真空至 133Pa 以下，干燥至恒重。通入干燥空气，计算供试品水分含量。

4 结果计算

$$\text{供试品水分含量}(\%) = \text{干燥失重} \div \text{供试品重量} \times 100\%$$

5 结果判定

两份测定供试品的结果均应在规定限度内。

6 注意事项

所用仪器应干燥，并能避免空气中水分的侵入，测定应在干燥处进行。

起草人：石继春 徐潇

复核人：叶强

游离甲醛测定法

在疫苗生产过程中，甲醛普遍应用于病毒的灭活。然而，甲醛可对人的中枢神经系统、呼吸系统、消化系统和内分泌系统造成损害，因此，对疫苗中的残留甲醛应进行严格控制。

对于游离甲醛的测定有多种方法，对含量较高的样品如甲醛溶液采用滴定法，对含量较低的样品已报道的方法有气相色谱法、液相色谱法、分光光度法、极谱法、催化动力学法等。但有些方法的检测效果虽然较好，但所用仪器价格昂贵，难以普及。对于生物制品中残留游离甲醛的测定，目前仍以分光光度法为主。

《中国药典》2010 年版三部及以前收录的游离甲醛测定方法为亚硫酸品红比色法，其标准

曲线范围为 25~100 $\mu\text{g/ml}$, 对于低浓度甲醛样品无法准确测定, 且实验过程繁琐, 耗时较长(约 4 小时)。为更有效地控制生物制品的质量, 中国食品药品检定研究院参考了欧洲药典等检测方法, 在对检测波长、显色温度、反应时间、显色剂配制等进行比较基础上, 建立了改良乙酰丙酮比色法, 收录于《中国药典》2010 年版三部, 可对疫苗中游离甲醛残留量进行检测。

在进行游离甲醛测定时, 可根据情况选择下列一种方法进行测定。

第一法: 比色法

1 原理

紫外-可见分光光度法是通过测定被测物质在特定波长处或一定波长范围内光的吸收度, 对该物质进行定性和定量分析的方法。

本法系依据品红亚硫酸在酸性溶液中能与甲醛生成紫色复合物, 在 590nm 处能产生最大吸收, 采用比色法, 通过已知甲醛对照品准品溶液的浓度和其相应的吸光度得到标准曲线, 代入供试品的吸光度值, 得出供试品中的游离甲醛含量。

2 材料和设备

2.1 溶液和试剂 供试品、甲醛、品红亚硫酸溶液、硫酸溶液、亚硫酸钠、淀粉指示液、碘滴定液、过氧化氢(分析纯)、二氧化硫、溴麝香草酚蓝指示液、氢氧化钠滴定液。

2.1.1 品红亚硫酸溶液的制备及二氧化硫含量的标定: 称取碱性品红 4.5g 于 3L 锥形瓶中, 加水 1500ml, 振摇或加温使品红全部溶解, 待冷后, 加亚硫酸钠 10g, 摇匀, 静置 5~10 分钟, 再加入 3mol/L 硫酸溶液 40ml, 摇匀, 以橡皮塞塞紧瓶口, 放置过夜, 如有颜色, 加骨炭 5~10g 迅速摇匀, 以布氏漏斗快速抽滤, 即得品红亚硫酸溶液。品红亚硫酸溶液中的 SO_2 含量可控制在 28~48mmol/L (SO_2 含量过多可通空气驱除, 过少可通入 SO_2)。

2.1.2 二氧化硫 (SO_2) 含量测定: 量取品红亚硫酸溶液 10ml 于锥形瓶内, 加水 20ml, 淀粉指示液 5ml, 用碘滴定液 (0.05mol/L) 滴定至呈浅蓝色, 按下式计算 SO_2 的含量:

$$\text{SO}_2 \text{ 的含量 (mmol/L)} = 50 \times V \times c$$

式中 V 为消耗碘滴定液 (0.05mol/L) 的体积, ml;

c 为碘滴定液的浓度, mol/L。

2.1.3 甲醛溶液的标定: 取甲醛溶液约 1.5ml, 精密称定, 置锥形瓶中, 加水 10ml、过氧化氢溶液 25ml 与溴麝香草酚蓝指示液 2 滴, 滴加氢氧化钠滴定液 (1mol/L) 至溶液显蓝色; 再精密加入氢氧化钠滴定液 (1mol/L) 25ml, 瓶口置一玻璃小漏斗, 置水浴中加热 15 分钟, 不时振摇, 冷却, 用水洗涤漏斗, 加溴麝香草酚蓝指示液 2 滴, 用盐酸滴定液 (1mol/L) 滴定至溶液显黄色, 并将滴定的结果用空白试验校正。每 1ml 氢氧化钠滴定液 (1mol/L) 相当于 30.03 的甲醛。

2.1.4 对照品溶液制备: 精密量取已标定的甲醛溶液适量, 置 500ml 量瓶中, 用水稀释至刻度, 摇匀, 制成 0.05% 甲醛对照品贮备液。

临用前, 精密量取甲醛对照品贮备液 10ml, 置 100ml 量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀, 作为甲醛对照品溶液。

2.1.5 供试品溶液制备: 精密量取供试品 1ml, 用水稀释至甲醛含量约为 0.005%, 即为供试品溶液。

2.1.6 混合酸溶液制备：量取水 783ml，置烧杯内，缓缓注入盐酸 42ml、硫酸 175ml，混匀。

2.2 设备 紫外-可见分光光度计，比色皿，天平，量筒（经标化）。

3 操作方法

3.1 供试品制备 精密量取供试品溶液 1ml，置 50ml 具塞试管中，加水 4ml，加品红亚硫酸溶液 10ml，混合酸溶液 10ml，摇匀，于 25℃ 放置 3 小时。

3.2 甲醛对照品制备 精密量取 0.005% 甲醛对照品溶液 0.5ml、1.0ml、1.5ml、2.0ml，分别置 50ml 具塞试管中，加水至 5ml，加品红亚硫酸溶液 10ml，混合酸溶液 10ml，摇匀，于 25℃ 放置 3 小时；以不含甲醛的水为空白，同上操作。

3.3 测定 打开紫外-可见分光光度计，设定波长 590nm，分别将各对照品及供试品的反应液加入比色皿，读取吸光度值。

4 计算

4.1 本法的结果计算采用标准曲线法，用标准样品配制成不同浓度的标准系列，在与待测组分相同的测定条件下，测量吸光度，用吸光度对样品浓度绘制标准曲线，此标准曲线应是通过原点的直线。若标准曲线不通过原点，则说明存在系统误差。标准曲线的斜率即为绝对校正因子。

4.2 分别以甲醛对照品溶液的浓度及其相应的吸光度为横纵坐标，进行直线回归，将供试品溶液的吸光度代入直线回归方程，计算供试品中的游离甲醛含量。

5 结果与判定

将计算获得的供试品游离甲醛含量与经批准的产品质量标准进行比较，若符合产品质量标准中游离甲醛含量要求，则判定为合格。

6 注意事项

6.1 所有试剂应达到分析纯级别。

6.2 标准曲线的回归系数（ r ）应达到 0.98。

6.3 对具体品种，应按照定量加标的方法进行准确性和重复性验证，以确定样品的干扰因素、方法的线性范围、最低检出限及其适用性等。

6.4 由于品红亚硫酸试剂能跟醛作用显紫色，与酮作用不显色。这一显色反应非常灵敏，可用于鉴别醛类化合物。使用这种方法时，溶液中不能存在碱性物质和氧化剂，也不能加热，否则会消耗亚硫酸，溶液恢复品红的红色，出现假阳性反应。

6.5 品红亚硫酸试剂的保存：品红亚硫酸试剂应装入棕色瓶中塞紧瓶塞，保存在冰箱内（0~4℃）。用前预先取出，使之恢复至室温后再用。如溶液呈粉红色就不能用，须重配，一般配完 2 天之内使用。

起草人：杨英超

复核人：马霄

第二法：乙酰丙酮比色法

1 原理

本法系用汉栖反应（Hantzsch Reaction）原理测定微量游离甲醛的含量。甲醛在接近中性的乙酰丙酮、铵盐混合溶液中，生成黄色的产物 [3,5-二乙酰基-1,4-二氢二甲基吡啶（DDL）]，该产物在波长 412nm 处的吸光度与甲醛含量呈正比，据此以甲醛对照品溶液的浓度（ $\mu\text{g/ml}$ ）对其相应的吸光度作直线回归，将供试品溶液吸光度代入直线回归方程，计算出供试品中游离甲醛。

2 材料和设备

2.1 仪器 紫外-可见分光光度计、电子天平、离心机、振荡器、水浴箱。

2.2 材料 量筒、量瓶、带塞 10~15ml 离心管，5ml、1ml 移液器及相应的吸头、定时器、溶液瓶。

2.3 试剂 甲醛、乙酸铵、乙酸、乙酰丙酮、超纯水。

3 操作方法

3.1 溶液制备

3.1.1 甲醛对照品溶液 精密量取已标定的甲醛溶液适量，置 500ml 量瓶中，用水稀释至刻度，摇匀，制成 0.05%（W/V）甲醛对照品贮备液。临用前，精密量取贮备液 20ml，置 100ml 量瓶中，加水稀释至刻度，摇匀，即为每 1ml 含 100 μg 甲醛的对照品溶液。

3.1.2 乙酰丙酮显色液 称取乙酸铵 150g，加入适量水溶解，再加入乙酸 3ml、乙酰丙酮 2ml，摇匀，定容至 1000ml。室温避光保存，在规定的时间内使用。

3.2 试验步骤 精密量取一定体积供试品置试管中，加水至 5ml，加乙酰丙酮显色液 5ml，摇匀，40℃水浴放置 40 分钟后取出，降至室温（约 10 分钟），照紫外-可见分光光度法，在波长 412nm 处测定吸光度（显色后，若发现溶液浑浊，经每分钟 3000 转离心 15 分钟后，取上清测定）。

取甲醛对照品溶液分别稀释制成 0.25 $\mu\text{g/ml}$ 、0.5 $\mu\text{g/ml}$ 、1 $\mu\text{g/ml}$ 、5 $\mu\text{g/ml}$ 、25 $\mu\text{g/ml}$ 、50 $\mu\text{g/ml}$ 、75 $\mu\text{g/ml}$ 、100 $\mu\text{g/ml}$ ，精密量取上述不同浓度的对照品溶液各 1ml，自“加水至 5ml”起，同法操作。

准确量取水 5ml，自“加乙酰丙酮显色液 5ml”起，同法操作，作空白对照。

空白对照、各不同浓度的对照品溶液及供试品平行测试两管。

4 计算

4.1 用甲醛对照品溶液的浓度（ $\mu\text{g/ml}$ ）与相应的吸光度均值作直线回归，相关系数应不低于 0.98；将供试品溶液吸光度均值代入直线回归方程，计算供试品溶液游离甲醛含量 F（ $\mu\text{g/ml}$ ）。

$$F = a + bX$$

式中，X 为吸光度值，F 为所取体积（Vml）供试品中游离甲醛的浓度（ $\mu\text{g/ml}$ ）。

4.2 供试品中游离甲醛含量（ $\mu\text{g/ml}$ ）= F/V。

5 结果与判定

供试品中游离甲醛的含量在规定的范围之内即为合格。

6 注意事项

6.1 乙酰丙酮显色液应在规定的时间内使用。

6.2 各制品成分对该项目检测方法有影响应排除干扰因素，亦可选用其他适宜的方法检测。

6.3 标准曲线的线性范围可根据各自品种游离甲醛含量、最低检测线特点设定。

6.4 如果发现制品游离甲醛含量较低，可通过量取多一些体积样品后加水至 5ml 的方式，增加游离甲醛量以提高吸光度值；如果制品游离甲醛含量较高，可通过量取少些体积样品、多补些体积水的方式（加水至 5ml），使游离甲醛含量在线性范围内，以满足准确定量的需要。

起草人：方鑫

复核人：胡忠玉

聚乙二醇残留量测定法

1 原理

聚乙二醇（PEG）是一种无毒的亲水性聚合物，其用于生物大分子的分离始于 20 世纪 60 年代，最早用于提纯免疫球蛋白（IgG）以及一些细菌和蛋白，后来广泛用于核酸、蛋白质和酶的分离纯化。PEG 亲水性强，分子量范围广，蛋白分离制备中应用较广泛的是 PEG 2000-6000，分子量超过 20000 的 PEG，由于黏度大，操作不便，很少应用。此外，随着蛋白质工程技术的深入研究，聚乙二醇修饰技术也成为改良蛋白药物最有效的技术之一，得到越来越广泛的应用。有研究揭示 PEG 可能是一种半抗原，因而应进行质量控制。

本法系依据聚乙二醇与钡离子和碘离子形成复合物（1:1），将聚乙二醇对照品溶液的浓度（ $\mu\text{g/ml}$ ）与相应的吸光度作直线回归，将供试品溶液吸光度代入直线回归方程，计算供试品溶液聚乙二醇含量。

2 材料和设备

2.1 仪器 紫外-可见分光光度计、电子天平、离心机、振荡器。

2.2 设备 量筒、量瓶、10~15ml 离心管，5ml、1ml 移液枪及相应的吸头、定时器、溶液瓶、比色皿、洗瓶、吸水纸、擦镜纸、瓶签。

2.3 试剂 碘、碘化钾、高氯酸、氯化钡、聚乙二醇（与供试品中聚乙二醇分子量相同）、牛血清白蛋白、超纯水。

3 操作方法

3.1 溶液制备

3.1.1 0.1mol/L 碘溶液：称取 2.0g 碘化钾，加少量水溶解，再加 1.3g 碘溶解，加水定容至 50ml。

3.1.2 0.5mol/L 高氯酸溶液：取 0.05mol 高氯酸，加水稀释至 100ml。

3.1.3 氯化钡溶液：取 5g 氯化钡，加水使溶解成 100ml。

3.1.4 聚乙二醇对照品贮备液：精密称取聚乙二醇 0.010mg，加水溶解、定容至 100ml，制成每 1ml 含聚乙二醇 100 μ g 的对照品贮备液。

3.1.5 1%蛋白溶液：称取 1.0g 牛血清白蛋白，加水溶解、稀释至 100ml

3.1.6 供试品溶液（如供试品蛋白质含量高时）：取供试品适量，用水稀释，使蛋白质含量不高于 1%，即为供试品溶液。

3.2 供试品测定 精密量取供试品溶液 1.0ml（蛋白质含量不高于 1%），加入 0.5mol/L 高氯酸溶液 5.0ml，混匀，室温放置 15 分钟，每分钟 4000 转离心 10 分钟。取上清液 4.0ml，加入氯化钡溶液 1.0ml 和 0.1mol/L 碘溶液 0.5ml，混匀，室温反应 15 分钟，照紫外-可见分光光度法，在波长 535nm 处测定吸光度。同时以 1ml 水代替供试品溶液，同法操作，即为空白对照。

按表 1 制备每 1ml 含 10~50 μ g 不同浓度的聚乙二醇对照品溶液各 1.0ml，加入 0.5mol/L 高氯酸溶液 5.0ml，混匀，自上述“室温放置 15 分钟”起，同法操作。各个浓度的对照品溶液及供试品平行测试两管。

表 1 不同浓度聚乙二醇对照品溶液的制备

加样量	对照品管						样品 1	样品 2
水 (ml)	1.0	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	—	—
PEG 对照品贮备液 (ml)	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	—	—
样品 (ml)	—	—	—	—	—	—	1.0	1.0
1%蛋白溶液 (ml)	—	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	—	—
对应 PEG 量 (μ g/ml)	0	10	20	30	40	50	—	—

4 计算

4.1 用聚乙二醇对照品溶液的浓度 (μ g/ml) 与相应的吸光度均值作直线回归，相关系数应不低于 0.98；将供试品溶液吸光度均值代入直线回归方程，计算供试品溶液聚乙二醇含量 F (μ g/ml)。

$$F = a + bX$$

式中，X 为吸光度值，F 为聚乙二醇的浓度 (μ g/ml)。

4.2 供试品聚乙二醇含量 ($\mu\text{g/ml}$) = $F \times n$

供试品聚乙二醇含量 (g/L) = $F \times n \times 10^{-3}$

式中, n 为供试品稀释倍数。

5 结果与判定

5.1 直线回归相关系数应不低于 0.98, 试验有效。

5.2 供试品中聚乙二醇的含量在规定的范围之内即为合格。

6 注意事项

6.1 量瓶、量筒、移液枪均应经过检定/校验、洗净后使用。

6.2 使用仪器前要了解具体仪器、比色皿使用、维护保养方法; 仪器经过检定/校验后使用。

6.3 使用时注意, 开机初始化时不能打开仪器盖子, 比色皿不能放在槽内, 可以先对所测样品的任意一浓度在仪器波长范围内扫描, 找出最大吸收波长, 然后再最大波长下进行定量测定, 每个溶液测定时先用该溶液润洗比色皿 2~3 次, 倒入比色皿中液体约 2/3, 然后用擦镜纸擦干比色皿外壁, 比色皿每次放入方向相同; 标准曲线法测量时, 需用空白孔校零 (除含待测成分外的与样品一致的溶液或规定的空白对照校零)。

6.4 要准确加入等体积显色剂, 显色温度、显色时间一致, 供试品含量在线性范围内, 每次测定时同时做标准曲线。

6.5 比色过程应在试剂加入后的 15~45 分钟内完成。

6.6 本法的灵敏度随被测聚乙二醇的分子量增加而提高。

6.7 1% 蛋白质溶液系用不含聚乙二醇的蛋白质配制。

6.8 制品使用该方法检测时应进行适用性研究以排除干扰; 如果发现制品中吐温或其他物质存在对该项目检测方法有影响, 亦可选用其他适宜的方法检测。

起草人: 何鹏

复核人: 胡忠玉

抗生素残留量测定法

在进行抗生素残留量测定时, 可根据情况选择下面一种方法进行检测。

第一法: ELISA 法

生物制品生产中常添加的抗生素为庆大霉素、卡那霉素和新霉素, 其残留量测定方法

如下。

1 原理

生物制品中残留庆大霉素、卡那霉素和新霉素采用间接竞争 ELISA 法测定。其原理是制品中的抗原与酶标板包被的抗原竞争结合酶标抗体。制品中残留抗生素含量愈多，结合在固相上的酶标抗体愈少，最后的显色也愈浅。

2 材料和设备

2.1 材料和试剂 2ml 离心管，Tips，微量移液器（单道 20~200 μ l、200~1000 μ l；多道 250 μ l），去离子水，庆大霉素 ELISA 检测试剂盒，酶标仪。

2.2 设备 酶标仪。

3 操作方法

3.1 溶液的制备

3.1.1 洗涤工作液的制备 用去离子水将浓缩洗涤液按一定比例进行稀释（如，1份 20 \times 浓缩洗涤液+19份去离子水）用于酶标板的洗涤，洗涤工作液可在规定条件下保存备用。

3.1.2 供试品稀释液的制备 将供试品稀释液按试剂要求进行稀释，备用。

3.2 操作步骤

3.2.1 将所需试剂从冷藏环境中取出，置于室温（20~25 $^{\circ}$ C）平衡 30 分钟以上，注意每种液体试剂使用前均须摇匀。洗涤工作液在使用前也需回温。

3.2.2 取出需要数量的微孔板，将不用的微孔板放入自封袋，按试剂要求的条件保存备用。

3.2.3 编号：将供试品和参考品对应微孔按序编号，每个供试品和参考品做 2 孔平行，并记录标准孔和供试品孔所在的位置。

3.2.4 加参考品/样本：按试剂要求加入一定量的参考品/供试品到对应的微孔中，然后加入一定量的抗体工作液，轻轻振荡混匀，用盖板膜盖板后置要求的温度下避光环境中反应一定时间。

3.2.5 洗板：小心揭开盖板膜，将孔内液体甩干，加入一定量的洗涤工作液，充分洗涤数次，每次间隔一定时间，用吸水纸拍干（拍干后未被清除的气泡可用未使用过的枪头戳破）。

3.2.6 加入一定量的酶标二抗，轻轻振荡混匀，用盖板膜盖板后置要求的温度下避光环境中反应一定时间。取出重复洗板步骤 3.2.5。

3.2.7 显色：加入一定量的底物液 A 液，再加入一定量的底物液 B 液，轻轻振荡混匀，用盖板膜盖板后置要求的温度下避光环境中反应一定时间。

3.2.8 加入一定量的终止液，轻轻振荡混匀，设定酶标仪于规定的波长处，测定 OD 值，在 5 分钟之内读完数据。

4 实验成立的判定标准

试剂盒线性在规定的范围内；准确度应符合试剂盒的要求；精密度应符合试剂盒的

要求。

5 计算以及结果判断

通过四参数方程，根据参考品和供试品的 OD 值以及稀释倍数计算供试品中庆大霉素、卡那霉素或新霉素残留量，其中参考品曲线的 $R^2 \geq 0.98$ ：

庆大霉素、卡那霉素或新霉素的实际浓度 = 测定浓度 × 稀释倍数

庆大霉素、卡那霉素或新霉素的实际检测结果符合产品的质量标准要求，则判为合格。

6 注意事项

6.1 供试品处理方法 将供试品用 $1 \times$ 供试品稀释液稀释至庆大霉素、卡那霉素或新霉素的含量在试剂的线性范围内，每步稀释不得超过 10 倍。

6.2 测定前应将所有试剂和需用板条的温度回升至室温（ $20 \sim 25^\circ\text{C}$ ），使用之后立即将所有试剂放回 $2 \sim 8^\circ\text{C}$ 。

6.3 ELISA 分析中的再现性，很大程度上取决于洗板的一致性，正确的洗板操作是 ELISA 测定程序中的要点。

6.4 所有恒温孵育过程中，应避免光线照射，并用盖板膜封住微孔板。

6.5 室温低于 20°C 或试剂及供试品没有回到室温（ $20 \sim 25^\circ\text{C}$ ）会导致所有标准的 OD 值偏低。

6.6 在洗板过程中如果出现板孔干燥的情况，则会出现标准曲线不成线性，重复性不好的现象。所以洗板拍干后应立即进行下一步操作。

6.7 每加一种试剂前需要将其摇匀。

6.8 反应终止液为一定浓度的酸性溶液，避免接触皮肤。

6.9 不要使用过了有效日期的试剂盒；也不要使用过了有效期的试剂盒中的任何试剂，掺杂使用过了有效期的试剂盒会引起灵敏度的降低；不要交换使用不同批号试剂盒中的试剂。

6.10 储存条件 保存试剂盒于 $2 \sim 8^\circ\text{C}$ ，不要冷冻，将不用的酶标板微孔板放进自封袋重新密封。标准物质和无色的发色剂对光敏感，因此要避免直接暴露在光线下。

6.11 试剂变质的迹象 发色试剂有任何颜色表明发色剂变质，应当弃之。0 标准的吸光度（ $450/630\text{nm}$ ）值小于 0.5（ $A_{450\text{nm}} < 0.5$ ）时，表示试剂可能变质。

6.12 在加入底物液 A 液和底物液 B 液后，按规定时间显色，时间过长或过短都会影响结果的判断。

起草人：刘欣玉 吴星 邱少辉

审核人：李玉华 胡忠玉

第二法：培养法

1 原理

本法系依据在琼脂培养基内抗生素对微生物的抑制作用，比较对照品与供试品对接种的试

验菌产生的抑菌圈的大小，检查供试品中氨苄西林或四环素残留量。

2 材料和设备

2.1 试剂材料

2.1.1 磷酸盐缓冲液 取 8.0g 磷酸二氢钾，2.0g 磷酸氢二钾，加蒸馏水溶解成 1000ml 的溶液，经 121℃ 灭菌 30 分钟，室温保存。使用期限不得超过 12 个月。

2.1.2 抗生素Ⅱ号培养基 取 6g 胨，15g 牛肉提取粉，6g 酵母浸出粉，加入适量蒸馏水溶解后加入 13~14g 琼脂，加热使其溶胀，过滤除去不溶物；加入 1g 葡萄糖，溶解后加蒸馏水至 1000ml，调 pH 值为 6.5~6.6；分装于玻璃管或锥形瓶中，经 115℃ 灭菌 30 分钟。4℃ 保存。使用期限不得超过 6 个月。

2.1.3 对照品溶液 取氨苄西林对照品适量，用 0.01mol/L 盐酸溶解并稀释成每 1ml 中含氨苄西林 10mg 的溶液，精密量取适量，用磷酸盐缓冲液稀释成每 1ml 中含 1.0μg 的溶液，-20℃ 条件下保存。使用期限不得超过 3 个月。

取四环素对照品适量，用无菌 0.9% 氯化钠溶液溶解并稀释成每 1ml 中含 0.125μg 的溶液，-20℃ 条件下保存。使用期限不得超过 3 个月。

2.1.4 检定用菌种 金黄色葡萄球菌（26003）悬液，用于检测氨苄西林。取金黄色葡萄球菌营养琼脂培养物，接种于营养琼脂斜面，于 37℃ 培养 24 小时。临用时，用灭菌水或无菌 0.9% 氯化钠溶液将菌苔洗下，备用。

藤黄微球菌（28001）悬液，用于检测四环素。取藤黄微球菌营养琼脂培养物，接种于营养琼脂斜面，于 27℃ 培养 24 小时。临用时，用灭菌水或无菌 0.9% 氯化钠溶液将菌苔洗下，备用。

2.1.5 钢管（内径 6~8mm、壁厚 1~2mm、管高 10~15mm 的不锈钢管，表面应光滑平整）、培养皿、移液器、试管等应干燥无菌。

2.2 设备 洁净工作台。

3 操作方法

3.1 制备测定板底层 取 1 只直径 8cm 或 10cm 的培养皿，倒入 15~20ml 融化的抗生素Ⅱ号培养基，铺制约 3mm 厚的测定板底层，放置水平台上使其凝固待用。

3.2 制备测定板菌层 取 10~15ml 抗生素Ⅱ号培养基置于 1 支 50℃ 水浴预热的试管中，加入 0.5%~1% 的菌液混匀，取适量倒入已铺制底层的测定板中，放置水平台上，冷却凝固待用。

3.3 加样培养 在测定板上均匀放置钢管，于钢管中依次加满供试品、阴性对照（磷酸盐缓冲液）及阳性对照。测定板置于 37℃ 条件下培养 18~22 小时。

4 结果与判定

对照品溶液有抑菌圈，阴性对照溶液无抑菌圈。供试品溶液抑菌圈的直径小于对照品溶液抑菌圈的直径时判为阴性；否则判为阳性。

5 注意事项

- 5.1 本试验应在无菌条件下进行，使用的玻璃、钢管等应无菌。
- 5.2 确保测定板菌层平整。

起草人：郭莹 杨靖清

复核人：饶春明 周勇

牛血清白蛋白残留量测定法

1 原理

采用双抗体夹心法的原理，以抗牛血清白蛋白（BSA）单克隆抗体作为包被抗体，以酶标抗 BSA 多抗为检测抗体，以高灵敏度的 TMB 为显色底物，检测复合物的吸收值，由吸收值对标准中 BSA 浓度作一条标准曲线，未知样品的 BSA 浓度即可由样品的吸收值与标准曲线比较得出。

2 材料和设备

- 2.1 材料 定量检测牛血清白蛋白酶联免疫试剂盒、移液器及相应的滴头。
- 2.2 设备 酶标仪、37℃恒温水浴箱。

3 操作方法

- 3.1 将浓缩洗涤液用蒸馏水做 10 倍稀释。
- 3.2 取出包被有抗 BSA 96 孔板，加 BSA 标准品，即 0ng/ml、2.5ng/ml、5ng/ml、10ng/ml、20ng/ml、40ng/ml，各 50 μ l/孔，各浓度做平行两孔。
加供试品、内部参比品各两孔，50 μ l/孔，加样过程须在 15 分钟内完成。
- 3.3 37℃恒温水浴箱孵育 1 小时，用洗液洗涤 3 遍，拍干。
- 3.4 将酶标记抗体用酶标抗体稀释液做 1:100 稀释，加入各反应孔，100 μ l/孔（酶标记抗体现用现配）。
- 3.5 室温（20~25℃）避光反应 30 分钟。用洗涤液洗涤 4 遍，拍干。
- 3.6 用移液器加 TMB 底物显色液，50 μ l/孔，轻柔震荡 5 秒将其混匀。
- 3.7 避光室温（20~25℃）孵育 10 分钟。
- 3.8 用移液器加终止液，50 μ l/孔，轻柔震荡 20 秒混匀。
- 3.9 2 分钟内用酶标仪于 450nm 波长下读数。

4 结果计算

计算公式： $y=ax+b$

5 结果判定

5.1 实验有效参数：实验结果须同时满足以下有效参数为成立。

BSA 标准品 OD 值： $0\text{ng/ml} \leq 0.15$ ； $40\text{ng/ml} \geq 0.70$ ；内部参比对照 $27 \sim 34\text{ng/ml}$ ； $R^2 \geq 0.97$ ；同一样本两平行孔 OD 值（大/小 ≤ 1.24 ）。

5.2 判定条件：标准曲线中，设 $OD_{0-20\text{ng/ml}}$ 为区间 A； $OD_{20-40\text{ng/ml}}$ 为区间 B；大于 $OD_{40\text{ng/ml}}$ 为区间 C。

5.2.1 如测定值小于 2.5ng/ml ，则 BSA 含量测定结果计为小于 2.5ng/ml 。

5.2.2 如不同稀释浓度的供试品测得的 OD 值均位于区间 A，则最终结果计算取其最低稀释度的测定值。

5.2.3 如不同稀释度的测定 OD 值均位于区间 B、或同时位于区间 A 和 B、或同时位于区间 B 和 C，则取其最接近 $OD_{20\text{ng/ml}}$ 的测定值。

5.2.4 如不同稀释度测定值均位于区间 C，则供试品应进一步稀释测定，使其测定值居 $2.5 \sim 40\text{ng/ml}$ 所对应的 OD 值区间。

5.2.5 如高稀释度测得 OD 高于低稀释度或未稀释的 OD，则可能是操作失误或供试品中 BSA 含量过高（HOOK 效应），需重试或调整稀释度。

5.2.6 最终结果要考虑稀释因素（实际 BSA 含量=计算值×稀释倍数）。

6 注意事项

6.1 移液器吸头，加样本槽、1.5ml 离心管应一次性使用，不得重复使用。

6.2 包被板开封后尽快用完。

6.3 加标准品、供试品、酶标多抗、底物液、终止液时，各孔内不得有气泡。

起草人：孔艳

复核人：李玉华

外源性 DNA 残留量测定法

在进行外源性 DNA 残留量测定时，可根据供试品情况选择下列任何一种方法进行测定。

第一法：DNA 探针杂交法

1 原理

供试品中的外源性 DNA 经变性为单链后吸附于固相膜上，在一定条件下可与相匹配的单链 DNA 复性而重新结合成为双链 DNA，称为杂交。将特异性单链 DNA 探针标记后，与吸附在固相膜上的供试品单链 DNA 杂交，并使用与标记物相应的显示系统显示杂交结果，与已知含量的阳性 DNA 对照比对后，可测定供试品中外源性 DNA 残留量。

2 材料和设备

2.1 试剂与材料

2.1.1 DNA 标记和检测试剂盒 (DNA Labeling and Detection Kit)。其中各试剂依次记为 Kit-^{*}。

2.1.2 DNA 杂交膜：尼龙膜或硝酸纤维素膜。

2.1.3 2%蛋白酶 K 溶液：配制 50mmol/L Tris-Cl (pH 8.0) 和 1.5mmol/L 醋酸钙溶液 100ml，称取蛋白酶 K 0.20g，充分溶解，分装后储藏于 -20℃ 备用。

2.1.4 3%牛血清白蛋白溶液：称取牛血清白蛋白 0.30g，溶于 10ml 灭菌水中。

2.1.5 1mol/L 三羟甲基氨基甲烷 (Tris) 溶液 (pH 8.0)：称取三羟甲基氨基甲烷 (Tris) 121.1g 溶于 800ml 水中，加入盐酸调 pH 值至 8.0，加水定容至 1000ml，高压蒸汽灭菌。

2.1.6 3mol/L 乙酸钠 (NaAc) 溶液 (pH 5.2)：称取乙酸钠 (NaAc · 3H₂O) 40.8g 溶于 80ml 水中，加入乙酸调 pH 值至 5.2，加水定容至 100ml，高压蒸汽灭菌。

2.1.7 5.0mol/L 氯化钠溶液：称取氯化钠 29.2g，溶于 80ml 水中，加水定容至 100ml，高压蒸汽灭菌。

2.1.8 0.5mol/L 乙二胺四乙酸二钠溶液 (pH 8.0)：称取乙二胺四乙酸二钠 18.61g，溶于 80ml 水中，用磁力搅拌器剧烈搅拌，加 10mol/L NaOH 调节 pH 值至 8.0，加水定容至 100ml，高压蒸汽灭菌。

2.1.9 0.2mol/L 乙二胺四乙酸二钠溶液 (pH 8.0)：量取 0.5mol/L EDTA 溶液 40ml (pH 8.0)，加水定容至 100ml，高压蒸汽灭菌。

2.1.10 20%十二烷基硫酸钠 (SDS) 溶液：称取 SDS 20g，溶于 90ml 水中，加热至 68℃ 助溶，加浓盐酸调 pH 值至 7.2，加水定容至 100ml。

2.1.11 蛋白酶 K 缓冲液 (10 倍浓缩)：100mmol/L Tris-HCl，100mmol/L EDTA，1mol/L NaCl，5% SDS (W/V)，pH 8.0。量取 1mol/L 三羟甲基氨基甲烷 (Tris) 溶液 (pH 8.0) 1.0ml，5.0mol/L 氯化钠溶液 2.0ml，0.5mol/L 乙二胺四乙酸二钠溶液 (pH 8.0) 2.0ml，20% SDS 溶液 2.5ml，加灭菌水定容至 10ml。

2.1.12 TE 缓冲液 (10mmol/L Tris-HCl，1mmol/L EDTA，pH 8.0)：量取 1mol/L 三羟甲基氨基甲烷 (Tris) 溶液 (pH 8.0) 10ml，0.5mol/L 乙二胺四乙酸二钠溶液 (pH 8.0) 2ml，加灭菌水定容至 1000ml。

2.1.13 1%鱼精 DNA 溶液：精密称取鱼精 DNA 0.10g，置 10ml 量瓶中，用 TE 缓冲液溶解并稀释至刻度，摇匀，用 7 号针头反复抽打以剪切 DNA 成为小分子，分装后储藏于 -20℃ 备用。

2.1.14 DNA 稀释缓冲液: 量取 1% 鱼精 DNA 溶液 50 μ l, 加 TE 缓冲液定容至 10ml。

2.1.15 SSC 溶液 (20 倍浓缩): 称取氯化钠 175g, 柠檬酸三钠 \cdot 2H₂O 88g, 溶于 900ml 水中, 加入盐酸调 pH 值至 7.0, 加水定容至 1000ml, 高压蒸汽灭菌。

2.1.16 预杂交液: 量取 SSC 溶液 (20 倍浓缩) 25ml, Kit-10 0.5g, N-十二酰肌氨酸 (N-Lauroylsarcosin) 0.1g, SDS 溶液 (20%) 0.1ml, BSA 0.1g, 变性的鱼精 DNA (1%) 1ml, 加水定容至 100ml。

2.1.17 缓冲液-1 (100mmol/L Tris-HCl, 150mmol/L NaCl, pH 7.5): 量取 1mol/L Tris-HCl 溶液 (pH 7.5) 100ml, 5mol/L 氯化钠溶液 30ml, 加灭菌水定容至 1000ml。

2.1.18 缓冲液-2: 量取缓冲液-1 100ml, 加 Kit-10 0.5g。

2.1.19 缓冲液-3 (100mmol/L Tris-HCl, 100mmol/L NaCl, pH 9.5): 量取 1mol/L Tris-HCl 溶液 (pH 7.5) 100ml, 5mol/L 氯化钠溶液 20ml, 加灭菌水定容至 1000ml。

2.1.20 碱性磷酸酶溶液 (A.P. Solution): 量取缓冲液-1 20ml, 加 Kit-8 8 μ l。

2.1.21 70% 乙醇溶液: 量取无水乙醇 70ml, 加灭菌水定容至 100ml。

2.1.22 标准品 大肠杆菌 DNA 残留量检测国家标准品: (2012) 国生标字 0026。CHO 细胞 DNA 残留量检测国家标准品: (2012) 国生标字 0027。NS0 细胞 DNA 含量测定标准品: 330004-201701。

2.2 仪器设备 抽滤加样器、真空加热器。

3 操作方法

3.1 探针制备

3.1.1 取标准品 DNA 1 μ g 置于一个新 Eppendorf 管中, 沸水浴加热 10 分钟, 迅速转入冰浴中冷却。

3.1.2 于变性处理的 DNA 样品中, 加入 Kit-5 2 μ l, Kit-6 2 μ l, 加水至 20 μ l, 加入 Kit-7 1 μ l, 置于 37 $^{\circ}$ C 保温 2 小时以上。

3.1.3 于上述反应体系中, 加入 EDTA 溶液 (0.2mol/L, pH 8.0) 2 μ l, NaAc 溶液 2.5 μ l, 无水乙醇 75 μ l, 置于 -20 $^{\circ}$ C 保温 2 小时以上。

3.1.4 15000 转/分钟离心 10 分钟, 小心弃去上清, 用 70% 乙醇浸洗沉淀, 抽干。

3.1.5 加入 TE 缓冲液 50 μ l 复溶上述沉淀为探针。

3.2 供试品、阳性和阴性对照处理

3.2.1 按表 1 对供试品、阳性和阴性对照进行蛋白酶 K 预处理, 37 $^{\circ}$ C 保温 4 小时以上, 保证酶切反应完全。

表 1 供试品、阳性和阴性对照的蛋白酶 K 预处理

	加样量	蛋白酶 K	蛋白酶缓冲液	牛血清白蛋白	加去离子水至终体积
供试品	100 μ l	1 μ l	20 μ l		200 μ l
D ₁	100 μ l	1 μ l	20 μ l	X μ l	200 μ l
D ₂	100 μ l	1 μ l	20 μ l	X μ l	200 μ l
D ₃	100 μ l	1 μ l	20 μ l	X μ l	200 μ l
阴性	100 μ l	1 μ l	20 μ l	X μ l	200 μ l

3.2.1 供试品的稀释 根据成品最大使用剂量,用 DNA 稀释液将供试品(原液)稀释至 1 人份剂量/100 μ l;如成品最大使用剂量较大,而供试品的蛋白含量较低,可用 DNA 稀释液将供试品稀释至(1/10 人份剂量)/100 μ l 或(1/100 人份剂量)/100 μ l。

3.2.2 D_1 、 D_2 、 D_3 为稀释的阳性 DNA 对照 用 DNA 稀释液将 DNA 稀释至 1000ng/ml,然后依次 10 倍稀释成 10ng/100 μ l (D_1), 1ng/100 μ l (D_2), 100pg/100 μ l (D_3) 三个稀释度;如成品使用剂量较大,而且 DNA 限量要求(100pg/剂量)较严格时,则需要提高 DNA 检测灵敏度,相应的阳性 DNA 对照应稀释成 100pg/100 μ l (D_1), 10pg/100 μ l (D_2), 1pg/100 μ l (D_3) 三个稀释度。阴性对照为 DNA 稀释液,空白对照为未进行蛋白酶 K 预处理 TE 缓冲液。

3.2.3 当供试品 1/100 人份剂量大于 100 μ l 时,终体积也随之增大,一般终体积为供试品体积的一倍左右,供试品体积和终体积相差过小,可能会影响蛋白酶 K 的活性。

3.2.4 2%蛋白酶 K 和蛋白酶缓冲液的比例为 1/20,蛋白酶缓冲液和终体积的比例为 1/10。

3.2.5 加入 3%牛血清白蛋白 X μ l,是为了使阳性对照中有一定的蛋白质,以和供试品(通常为蛋白质)的酶切条件保持一致;如供试品为其他物质,则应改用其他相应物质。

3.2.6 若预处理后的供试品溶液中的蛋白质干扰试验,可用上述饱和酚抽提法或其他适宜方法提取供试品 DNA(阳性对照、阴性对照也应再次提取 DNA,与供试品溶液平行)。

3.3 点膜

3.3.1 按标尺剪下一块膜,要能覆盖抽滤加样器上所有孔,剪下一只角作为标记。

3.3.2 膜预先在干净的塑料纸上用 TE 缓冲液浸润。

3.3.3 将预处理的供试品、阳性对照、阴性对照与空白对照置 100 $^{\circ}$ C 水浴 10 分钟,迅速冰浴冷却,8000 转/分钟离心 5 秒。

3.3.4 用抽滤加样器点样于杂交膜(因有蛋白质沉淀,故要视沉淀多少确定加样量,所有供试品与阳性对照、阴性对照、空白对照要加同样体积,或按同样比例加样)。

3.3.5 晾干后置 80 $^{\circ}$ C 真空干烤 1 小时以上。或使用紫外交联仪,按仪器操作说明进行。

3.4 预杂交:经烘干的膜,封入干净的塑料袋中,加入预杂交液 10ml,置于 68 $^{\circ}$ C 保温 4 小时。

3.5 按步骤 3.1 制备的探针置于沸水浴中加热 10 分钟,迅速转入冰浴中冷却。取约 10 μ l 探针补加预杂交液 1.5ml 为杂交液。

3.6 杂交:取出完成步骤 3.4 的膜弃去预杂交液,加入步骤 3.5 制备的杂交液,置于 68 $^{\circ}$ C 保温过夜。

3.7 洗膜(所用液体用前需 68 $^{\circ}$ C 预热)

3.7.1 用 20 \times SSC、0.1% SDS 100ml 洗 2 次,每次室温 5 分钟。

3.7.2 用 0.1 \times SSC、0.1% SDS 100ml 洗 2 次,每次室温 15 分钟。

3.8 显色

3.8.1 加入缓冲液-1 20ml 清洗 1 次。

3.8.2 加入缓冲液-2 35ml 静置 1 小时。

3.8.3 加入缓冲液-1 20ml 清洗 1 次。

3.8.4 加入碱性磷酸酶溶液 10ml 放置 40 分钟。

3.8.5 缓冲液-1 摇洗 3 次,每次 15 分钟。

3.8.6 缓冲液-3 摇洗 2 分钟。

3.8.7 现配显色液:取缓冲液-3 10ml,加 Kit-9 200 μ l。

3.8.8 将膜置于显色液中,避光静置 1~3 小时左右。至阳性对照样品显色深度适当时,加入 TE 缓冲液 10ml 终止反应,晾干膜。

4 结果

阳性对照样品应按浓度由高到低呈现一定的颜色梯度，将待检样品的显色深度与阳性对照样品进行比较，可以得到限量分析结果。

5 注意事项

5.1 探针片段大小应在 100~1000bp 之间，每次标记的探针应先按试剂盒说明书进行探针标记效率实验。

5.2 供试品应用本法测定时应同步进行回收率试验。

5.3 对本方法有抑制性的供试品，应进行适当的样品前处理。

第二法：荧光染色法

1 原理

应用双链 DNA 荧光染料与双链 DNA 特异结合形成复合物，在波长 480nm 激发下产生强荧光信号，可用荧光酶标仪在波长 520nm 处进行检测，在一定的 DNA 浓度范围内以及在荧光染料过量的情况下，荧光强度与 DNA 浓度成正比，根据供试品的荧光强度，计算供试品中的 DNA 残留量。

2 材料和设备

2.1 试剂

2.1.1 1mol/L 三羟甲基氨基甲烷 (Tris) 溶液 (pH 7.5) 用盐酸调 pH 值至 7.5。

2.1.2 0.5mol/L 乙二胺四乙酸二钠溶液 (pH 7.5) 用 10mol/L 氢氧化钠溶液调 pH 值至 7.5。

2.1.3 TE 缓冲液 (pH 7.5) 量取 1mol/L Tris 溶液 (pH 7.5) 1.0ml、0.5mol/L 乙二胺四乙酸二钠溶液 (pH 7.5) 0.2ml，加灭菌注射用水至 100ml。

2.1.4 双链 DNA 荧光染料。

2.1.5 DNA 标准品 见第一法。

取 DNA 标准品适量溶于 TE 缓冲液中，制成 10 μ g/ml DNA 标准品，于 -20 $^{\circ}$ C 保存。

2.2 仪器 荧光酶标仪。

3 操作方法

3.1 DNA 标准品溶液的制备 用 TE 缓冲液将 DNA 标准品配成 80ng/ml、40ng/ml、20ng/ml、10ng/ml、5.0ng/ml、2.5ng/ml、1.25ng/ml、0ng/ml 的标准品溶液。

3.2 精密量取 DNA 标准品溶液和供试品溶液各 400 μ l 于 1.5ml 离心管中，分别加入新配制的双链 DNA 荧光染料 400 μ l，混匀后，避光室温放置 5 分钟。

3.2.1 取 250 μ l 上述反应液于 96 孔黑色酶标板中，并做 3 个复孔。用荧光酶标仪在激发波长 480nm、发射波长 520nm 处测定荧光强度。

3.2.2 以 TE 缓冲液测得的荧光强度为本底，测定和记录各测定孔的荧光值。

4 结果

以标准品溶液的浓度对其相应的荧光强度作直线回归，求得直线回归方程 (相关系数应不

低于 0.99), 将供试品溶液的荧光强度代入直线回归方程, 求出供试品中 DNA 残留量。

5 注意事项

5.1 DNA 残留量在 1.25~80ng/ml 范围内, 本法线性较好, 因此供试品 DNA 残留量在该范围内可定量测定; 当 DNA 残留量低于 1.25ng/ml 时应为限量测定, 表示为小于 1.25ng/ml。

5.2 供试品首次应用本法测定时需要进行方法学验证, 验证内容至少包括精密度和回收率试验。若供试品干扰回收率和精密度, 应采用适宜方法稀释或纯化 DNA (可参见本项目第一法) 以排除干扰, 直至精密度和回收率试验均符合要求。需要纯化 DNA 后再进行测定的供试品, 每次测定均应从纯化步骤起增加回收率试验, 并用回收率对测定结果进行校正。

第三法: 定量 PCR 法

1 原理

PCR 反应过程中可通过荧光标记的特异性探针或荧光染料掺入而检测 PCR 产物量, 通过连续监测反应体系中荧光数值的变化, 可即时反映特异性扩增产物量的变化。在反应过程中所释放的荧光强度达到预设的阈值时, 体系的 PCR 循环数(Ct 值)与该体系所含的起始 DNA 模板量的对数值呈线性关系。采用已知浓度的 DNA 标准品, 依据以上关系, 构建标准曲线, 对特定模板进行定量分析, 测定供试品中的外源 DNA 残留量。

2 材料和设备

2.1 PCR 反应预混液 (2×) 含 MgCl₂、扩增酶、dNTPs 等, 按试剂使用说明书要求配制, 或符合条件的其它配方预混液。

2.2 TE 缓冲液 (pH 8.0) 同方法一。

2.3 荧光标记探针 用 TE 缓冲液稀释至 100μmol/L, -20℃保存。

2.4 正向和反向序列检测引物 用 TE 缓冲液稀释至 100μmol/L, -20℃保存。

2.5 碘化钠溶液 (6M 碘化钠, 15mmol/L EDTA, 0.5%月桂酰肌氨酸钠, 25mmol/L Tris-HCl pH 8.0 以及 35μg/ml 糖原): 配制 100ml 碘化钠溶液, 先取干净的烧杯置于磁力搅拌器上, 依次加入以下成分, 同时用搅拌子不断搅拌混匀: 50ml 的无核酸酶水, 3.0ml 的 0.5mol/L EDTA 溶液, 2.5ml 的 1mol/L Tris-HCl pH 8.0, 缓慢加入 89.93g 的碘化钠, 加入适量的无核酸酶水至 100ml (可根据需要等比增加或减少)。用 0.2μm 孔径的尼龙膜过滤溶液。避光 4℃储藏。

2.6 2%蛋白酶 K 溶液 同方法一。

2.7 蛋白酶 K 缓冲液 (10×), 同方法一但不加氯化钠, 或按蛋白酶 K 试剂说明书要求配制。

2.8 推荐的检测探针及引物

2.8.1 CHO 细胞

探针: 5' FAM-ACTCGCTCTGGAGACCAGGCTGGC-TAMRA3'

正向引物: 5' -TGTGTAGCTTTGGAGCCTATCCT-3'

反向引物: 5' -CAGCACTCGGGAGGCAGA-3'

2.8.2 大肠杆菌

探针: 5' FAM-CGGTGCTGCGACGGCGGAGT-TAMRA3'

正向引物: 5' -GAAAGTAACACCAGCGTGCG-3'

反向引物: 5'-CCAATGCATTAACGCTGGCA-3'

2.8.3 毕赤酵母

探针: 5' FAM-TAACTACGGTTGATCGGACGGGAAA-TAMRA3'

正向引物: 5'-ACACTACTCGGTCAGGCTCT-3'

反向引物: 5'-TTTCGGTTGCGGCCATATCT-3'

2.8.4 NS0 细胞

探针: 5' FAM-AGGGCCCCCAATGGAGGAGCT-TAMRA3'

正向引物: 5'-CCCCTTCAGCTCCTTGGGTA-3'

反向引物: 5'-GCCTGGCAAATACAGAAGTGG-3'

2.8.5 Vero 细胞

探针: 5' FAM-CCTTCAAGAAGCCTTTCGCTAAG-TAMRA3'

正向引物: 5'-GCTTTCTGAGAACTGCTCTGTGT-3'

反向引物: 5'-GGAAGATATTCCTTTTTCACCATAGC-3'

2.9 DNA 共沉淀染色剂

2.10 清洗液 A 按试剂(5)方法配制,含碘化钠 37.5g, 1mol/L Tris 缓冲液(pH8.4) 2.0ml, 0.5mol/L EDTA 溶液(pH8.4) 2.0ml, 异丙醇 50ml, N-月桂酰肌氨酸钠 0.5%(W/V), 加去离子水至总体积 100ml。

2.11 清洗液 B 含有 35μg/ml 糖原的乙醇(70%)水溶液。使用前, 将糖原加入 20ml 乙醇(70%)水溶液中至浓度为 35μg/ml, 混匀。

2.12 荧光定量 PCR 仪。

3 操作方法

3.1 DNA 提取方法 可采用碘化钠沉淀法或磁珠法等方法提取 DNA。碘化钠沉淀法按如下操作进行。若采用商业化试剂盒, 需经验证并按使用说明书进行操作。

3.2 DNA 标准品溶液的配制 用 TE 缓冲液将 DNA 标准品稀释成 1000pg/μl、100pg/μl、10pg/μl、1pg/μl、0.1pg/μl、0.01pg/μl、0.001pg/μl 的系列浓度梯度, 或其它适宜的浓度范围。DNA 标准品含量在 0.01pg/μl~100pg/μl 范围内本法线性较好。

3.3 DNA 浓缩/纯化 取 2.0ml 的离心管三只, 加入 250μl 的供试品溶液及 12.5μl 的无核酸酶的水作为供试品组; 加入 250μl 的供试品溶液及 12.5μl 的 DNA 标准品溶液作为加标组; 另加入 262.5μl 无核酸酶的水作为阴性对照组。

向管中分别加入 50μl 的蛋白酶 K 溶液和 50μl 的 10×蛋白酶 K 缓冲液混匀, 短暂离心确保所有溶液都在管底。在管中加入 137.5μl TE 以调整体积为 500μl。将上述离心管放入 56℃水浴锅内酶解 120 分钟; 加入 500μl 的碘化钠溶液(含糖原及月桂酰肌氨酸钠), 混匀后短暂离心, 置于 40℃水浴中孵育 15 分钟; 每个离心管加 DNA 共沉淀染色剂 1μl, 混匀, 再加入 900μl 的异丙醇, 再次混匀后, 室温静置 15 分钟; 13000g, 离心 30 分钟后用移液器弃去上清后将离心管倒置在吸水纸上, 使管壁的液体流尽, 各管中分别加入 800μl 清洗液 A, 轻弹离心管底使沉淀从管壁上脱离, 13000g, 离心 20 分钟用移液器弃去上清, 每管加入 1500μl 清洗液 B, 轻弹离心管底使沉淀从管壁上脱离, 13000g, 离心 30 分钟; 用移液器弃去上清, 将离心管倒置于吸水纸上 1 分钟, 使管壁的液体流尽, 倒转离心管, 正向开口置于超净台风干。每管加入 50μl TE 缓冲液, 轻弹离心管底, 40℃水浴静置 5~10 分钟以充分溶解 DNA。

3.4 检测（定量 PCR 法）

配制 PCR 反应体系：引物和探针用 TE 缓冲液稀释至 $10\mu\text{mol/L}$ ，吸取 DNA 标准品溶液和抽提后的 DNA 样品溶液，配制 PCR 反应体系。

每个 $25\mu\text{l}$ PCR 反应体系所需的成分如表 2 所示（不同的反应体系可适当调整）：

表 2 PCR 反应体系

PCR 反应预混液（ $2\times$ ）	12.5 μl
正向引物（ $10\mu\text{mol/L}$ ）	2.5 μl
反向引物（ $10\mu\text{mol/L}$ ）	2.5 μl
探针（ $10\mu\text{mol/L}$ ）	2.5 μl
DNA 标准品或供试品溶液	5 μl
合计	25

* 注：对于大肠杆菌和毕赤酵母，探针浓度使用 $5\mu\text{mol/L}$ 。

配制不含 DNA 模板的 PCR 反应混合液。于 96 孔反应板中分别加入 $20\mu\text{l}$ PCR 混合液，再移取稀释的 DNA 标准品、分子级水（无模板对照：NTC）、DNA 样品各 $5\mu\text{l}$ 至 96 孔反应板中，每个样品做 3 个复孔。反应板覆盖光学盖膜后，离心去除气泡。将反应板放置在荧光定量 PCR 仪中运行反应，设定如下参数：

阶段 1: 95°C ，10 分钟；阶段 2: 95°C ，15 秒， 60°C ，1 分钟，重复 40 个循环；样品体积： $25\mu\text{l}$ 。

4 结果

以 6 个标准品溶液浓度点生成标准曲线， R^2 值应 ≥ 0.98 ，斜率应在 -3.1 至 -3.8 范围内；标准品溶液浓度最低点的 Ct 值，不得高于 39。阴性对照组若有 Ct 值时，不得低于标准品溶液浓度最低点的 Ct 值；每组加标样品的回收率应在 $50\%\sim 150\%$ 之间， $RSD \leq 30\%$ 。适当情况下，可剔除第一个或者第六个点，以连续 5 个标准品溶液浓度点生成标准曲线，系统适用性仍应满足以上条件。以标准品溶液浓度的对数值对其相应的 Ct 值作直线回归，求得直线回归方程，供试品溶液的 Ct 值代入直线回归方程，求出供试品中 DNA 残留量。

5 注意事项

5.1 供试品首次应用本法测定时需要进行方法学验证，具体要求参照第二法。

5.2 引物及探针设计：建议针对具有种属特异性的高度重复序列进行设计。设计的引物及探针应经过验证，其灵敏度、特异性、重复性、精确性能够达到要求。

5.3 PCR 反应体系及反应条件可按照具体使用的仪器及试剂进行相应的调整，实验应在 PCR 洁净工作台内进行，排除核酸和核酸酶的污染。

5.4 可根据需要对供试品进行稀释或浓缩。

起草人：杨靖清 毕华 郑红梅
复核人：饶春明 周勇

宿主细胞蛋白质残留量检测

1 原理

宿主细胞蛋白质（HCP）残留是指生物制品/原液中含有的宿主细胞的蛋白质成分。通常采用夹心 ELISA 法测定制品中 HCP 的残留量，把 HCP 特异性抗体结合到固相载体上，将供试品与标记抗 HCP 抗体按不同的步骤与固相载体上的抗体进行免疫反应后，加入反应底物，底物被催化产生的信号值强度与 HCP 含量呈现一定的量效关系，形成标准曲线，根据供试品信号值进行 HCP 的定量检测。

目前有多种细胞基质被用于生物制品生产，如：原核细胞（大肠埃希菌）、酵母细胞（啤酒）、真核细胞（Vero、PHK、MDCK、HEK293、MRC-5、CHO 等）。根据生产中使用的宿主细胞的不同，检测方法应采用能特异性结合对应生产用宿主细胞蛋白质的包被抗 HCP 抗体、标记抗 HCP 抗体和 HCP 标准品。包被抗体和检测抗体均为多克隆抗体，应能够与来源于宿主细胞的蛋白特异性结合并具有足够的覆盖率。检测中使用的宿主细胞 HCP 标准品应具有代表性，其宿主细胞的 HCP 蛋白组分和含量应最大程度地与供试品一致/相似。

2 材料和设备

2.1 材料和试剂 抗 HCP 抗体包被的酶标板、标记抗 HCP 抗体、HCP 标准抗原、对照品、稀释液、洗液、底物液及终止液等 ELISA 常规试剂；96 孔酶联反应板，加液槽，吸水纸，移液器及相应 Tip 头等。

2.2 设备 恒温水浴箱，酶标仪。

3 操作方法

3.1 将宿主蛋白残留量 ELISA 检测试剂和供试品平衡至室温。

3.2 标准品/对照品/供试品的制备 按照检测要求制备所需稀释液用于标准品/对照品/对照品的稀释。

3.2.1 标准品 取宿主细胞 HCP 标准抗原，按照检测要求进行复溶（如需要）和稀释（如需要），制备规定浓度的系列标准品用于绘制标准曲线。

3.2.2 对照品 取宿主细胞 HCP 对照品，按照检测要求进行复溶（如需要）和稀释（如需要）。

3.2.3 供试品 将供试品按照检测要求进行稀释（如需要），供试品的稀释倍数应使检测结果位于标准曲线范围内。在不影响检测的情况下，如原倍供试品的检测结果仍低于检测限，按照 5.3 项的规定进行报告。

3.3 加样 将标准品/对照品/供试品加入至抗 HCP 抗体包被的酶标板，应多孔（ ≥ 2 ）平行检测，将已加样的 ELISA 板置于方法要求的温度，按照方法要求，温浴相应时间。

3.4 标记抗体的孵育 洗板后,将酶标抗体加入酶标板内,封膜,将 ELISA 板置于方法要求的温度,温浴相应时间。

注:如采用一步法检测,可将酶标抗体与待测样品共同加入酶标板。

3.5 显色 洗板后,将底物液加入板中,封膜后,按照方法要求,温浴相应时间显色。

注:如需加入酶标试剂与标记抗体结合后进行显色反应(如标记抗体为生物素标记,需加入酶偶联的亲合素进行显色反应),则需按照方法要求,在温浴完成后洗涤酶标板,并加入合适浓度的酶标试剂进一步温浴并洗涤,再进行显色。

3.6 终止及比色 显色结束后,加入终止液终止反应。置于酶标仪,按说明书规定波长进行吸光值测定。

4 计算

以 HCP 标准品的浓度及其对应的吸光度,按照说明书/检测要求所规定的分析方法,确定标准曲线;将供试品吸光度代入标准方程,得出供试品中 HCP 含量;供试品的 HCP 浓度为上述计算结果乘以相应稀释倍数。

5 结果与判定

5.1 根据 ELISA 检测试剂要求,标准曲线的 R^2 值、对照品浓度及其他系统适用性计算结果应符合要求,试验成立。

5.2 试验成立,方可计算供试品 HCP 残留量浓度。

5.3 如供试品中 HCP 含量太低,在不影响检测的前提下,原倍供试品的检测结果仍低于检测方法的检测限,则该供试品的 HCP 残留量为“低于检测限”。

5.4 按照质量标准规定,对供试品的检定结果进行判定。

6 注意事项

6.1 试验开始前,应将检测用试剂和供试品平衡到室温。

6.2 严格按照 ELISA 检测试剂说明书进行操作。

6.3 酶标仪应提前开启预热。

6.4 应尽可能取吸光度在标准曲线中间位置,且以低稀释倍数的吸光度计算供试品的 HCP 残留量。

起草人:王玲 张峰

复核人:李玉华 王兰

无菌检查法

1 原理

无菌检查法是为检测无菌工艺产品和终端灭菌产品的无菌性而建立的，在药典规定的培养条件下检查活的可培养微生物的一种定性检查方法。由于微生物污染分布的不均匀性，特别是当微生物污染率较低时，无菌检查的定性结论具有一定的局限性。产品的无菌性取决于生产过程中良好的无菌保证体系、经验证的有效灭菌工艺和遵照《药品生产质量管理规范》的要求管理，并严格执行产品在储存、运输、使用等环节中的防污染措施。因此，供试品若符合无菌检查法的规定，仅表明供试品在该检验条件下未发现微生物污染。

无菌检查应在符合规定的环境设施下进行，《中国药典》2015年版中给出了无菌检查环境的具体指导意见，即“无菌检查应在B级背景下的A级单向流洁净区域或隔离系统中进行”。本文介绍的是无菌隔离系统中的无菌检查方法。无菌检查人员必须具备微生物专业知识，并经过无菌技术的培训。

无菌检查法包括薄膜过滤法和直接接种法。只要供试品性状允许，应采用薄膜过滤法。制定用薄膜过滤法和直接接种法进行的无菌检查操作规范，确保无菌检查实验结果可靠。

2 材料和设备

2.1 溶液和试剂

2.1.1 硫乙醇酸盐流体培养基

胰酪胨	15.0g
酵母浸出粉	5.0g
无水葡萄糖	5.0g
L-胱氨酸	0.5g
硫乙醇酸钠（或硫乙醇酸）	0.5g（0.3ml）
氯化钠	2.5g
新配制的0.1%刃天青溶液	1.0ml
琼脂	0.75g
水	1000ml

除葡萄糖和刃天青溶液外，取上述成分混合，微温溶解，调节pH为弱碱性，煮沸，滤清，加入葡萄糖和刃天青溶液，摇匀，调节pH，使灭菌后在25℃的pH值为 7.1 ± 0.2 。分装至适宜的容器中，其装量与容器高度的比例应符合培养结束后培养基氧化层（粉红色）不超过培养基深度的1/2，灭菌。在供试品接种前，培养基氧化层的高度不得超过培养基深度的1/5，否则，须经100℃水浴加热至粉红色消失（不超过20分钟），迅速冷却，只限加热一次，并防止被污染。

2.1.2 胰酪大豆胨液体培养基

胰酪胨	17.0g
大豆木瓜蛋白酶水解物	3.0g
葡萄糖/无水葡萄糖	2.5g/2.3g
氯化钠	5.0g
磷酸氢二钾	2.5g
水	1000ml

除葡萄糖外，取上述成分，混合，微温溶解，滤过，调节 pH 使灭菌后在 25℃ 的 pH 值为 7.3 ± 0.2 ，加入葡萄糖，分装，灭菌。

2.1.3 胰酪大豆胨琼脂培养基

胰酪胨	15.0g
大豆木瓜蛋白酶水解物	5.0g
氯化钠	5.0g
琼脂	15.0g
水	1000ml

除琼脂外，取上述成分，混合，微温溶解，调节 pH 使灭菌后在 25℃ 的 pH 值为 7.3 ± 0.2 ，加入琼脂，加热溶化后，摇匀，分装，灭菌。

固体制剂稀释液：按产品标签说明的溶液作为稀释液，也可使用 0.1% 无菌蛋白胨水溶液、pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨水溶液或 0.9% 无菌氯化钠溶液。

稀释液/冲洗液：0.1% 无菌蛋白胨水溶液、pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨水溶液或 0.9% 无菌氯化钠溶液。也可根据供试品的特性，选择其他经验证过的适宜溶液作为稀释液、冲洗液。如需要，可在上述稀释液或冲洗液灭菌前或灭菌后加入表面活性剂或中和剂等。

2.1.4 菌种：金黄色葡萄球菌 CMCC (B) 26003。

2.2 材料 薄膜过滤器，一次性无菌注射器。

2.3 设备 全密闭集菌培养器，无菌隔离系统，生化培养箱（20~25℃，30~35℃），冰箱，集菌仪。

3 操作方法

3.1 检查前的准备

3.1.1 将培养基、全密闭集菌培养器及实验样品放入无菌隔离系统内，按自动运行程序对无菌隔离系统进行灭菌处理。

3.1.2 将全密闭集菌培养器安装在电脑集菌仪上。

3.2 供试品处理及接种培养基

3.2.1 供试液的处理 操作时，按 3.1.1 对供试品容器表面和取样部位进行彻底消毒。用灭菌镊取出注射器，将针芯插入针管并安上针头（或用一次性无菌注射器替代）。

3.2.1.1 供试品为水溶液供试品，可直接作为供试液备检，或混合至含适量稀释液的无菌容器内，混匀，作为供试液备检。

3.2.1.2 供试品为水溶性固体供试品，可按标签说明复溶后直接作为供试液备检，或者混合至含适量稀释液的无菌容器内，混匀，作为供试液备检。

3.2.1.3 供试品为非水溶性制剂供试品，可直接作为供试液备检（如油溶液），或混合溶于

含适宜表面活性剂的稀释液中，充分混合，作为供试液备检。

3.2.1.4 供试品为膏剂和黏性油剂供试品，可取规定量，混合至适量的无菌十四烷酸异丙酯中，剧烈振摇，使供试品充分溶解，如果需要可适当加热，但温度不得超过 44℃，保温，作为供试液备检。对仍然无法过滤的供试品，于含有适量的无菌十四烷酸异丙酯的供试液中加入不少于 100ml 的稀释液，充分振摇萃取，静置，取下层水相作为供试液备检。

3.2.1.5 供试品为无菌气（喷）雾剂供试品，将备检容器置于至少 -20℃ 的冰室冷冻约 1 小时，以无菌方式迅速在容器上端钻一小孔，释放喷射剂后再开启容器，并将供试品转移至无菌容器中，参照 3.2.1.1 或 3.2.1.3 的描述操作。

3.2.1.6 如供试品容器内有一定的真空度，需加入空气加压后便于抽出时，应用注射器抽取无菌空气注入供试品瓶内，供试品需用灭活剂溶解时，用灭活剂溶解后用适宜溶剂稀释至规定的浓度。

3.2.1.7 供试品为注射用无菌原料药，取样时为缩短暴露时间，应由两人操作。小心揭开瓶塞，用灭菌长柄不锈钢药匙取出规定量的样品，置经 1/1000 天平称定重量的灭菌试管中，密塞待用，立即盖好大包装瓶塞，用橡皮胶布及时封口，再用封箱纸包扎瓶口。如果容器内有一定的真空，可用适当的无菌器材（如一头带有除菌过滤器的针头），向供试品容器内导入无菌空气，再按无菌操作开启容器取出内容物。

3.2.1.8 供试品为注射器预充药物的供试品，取规定量，排出注射器中的内容物至无菌容器中，或吸入适宜稀释液或用标签所示的溶剂溶解。若预充药物的注射器与针头为一体包装，可按如上操作；若预充药物的注射器与针头分别独立包装，针头的无菌检查应采用直接接种法。

3.2.2 供试品的接种

3.2.2.1 薄膜过滤法 薄膜过滤法应优先选用封闭式薄膜过滤器，也可使用一般薄膜过滤器。无菌检查用的滤膜孔径应不大于 0.45μm，直径约为 50mm。根据供试品及其溶剂的特性选择滤膜材质。抗生素供试品应选择低吸附的滤器及滤膜。滤器及滤膜使用前应采用适宜的方法灭菌。使用时，应保证滤膜在过滤前后的完整性。

水溶性供试液过滤前先将少量的冲洗液过滤以润湿滤膜。油类供试品，滤膜和过滤器在使用前应充分干燥。为发挥滤膜的最大过滤效率，应注意保持供试品溶液及冲洗液覆盖整个滤膜表面。供试液经薄膜过滤后，若需要用冲洗液冲洗滤膜，每张滤膜每次冲洗量一般为 50ml 或 100ml，且总冲洗量不得超过 1000ml，以避免滤膜上的微生物受损伤。

3.2.2.1.1 取出无菌检查用集菌培养器，检查包装是否完好无损，将培养器逐一插放在滤液槽座上，将其塑胶软管装入集菌仪的蠕动泵的管槽内，注意定位准确，软管走势顺畅。其进液软管的双芯针头插入供试液容器的塞上，开启集菌仪。

3.2.2.1.2 待检样品 将供试液容器倒置，使药液均匀通过滤器，待药液滤净后，关闭电源，将双芯针头取下，插至装有适宜冲洗液容器的塞上，冲洗培养器滤膜，冲洗的量和次数根据验证结果确定（经验证无抑菌作用的供试品，薄膜过滤后，无需冲洗）。滤干后关闭电源。将培养器顶部排气孔处的胶帽取下，套住底部排液管口，将进液软管的双芯针头插至相应培养基容器的塞上，开启蠕动泵，将培养基导入指定培养器，关闭电源。用塑料卡卡住与培养器连接处的进液软管，在进液软管剪切线的位置剪断软管，将软管开口端套在培养器顶部的排气孔处。生物制品的无菌检查采用三联薄膜过滤器，其中两联分别导入硫乙醇酸盐流体培养基各

100ml, 一联置 30~35℃培养, 另一联置 20~25℃培养, 第三联滤器, 导入胰酪大豆胨液体培养基 100ml, 置 20~25℃培养。其他制品按有关规定进行。

3.2.2.1.3 阴性对照 供试品无菌检查时, 应取相应稀释液、冲洗液同法进行, 作为阴性对照。阴性对照不得有菌生长。同一次试验如果相应器具、稀释液和冲洗液相同, 可以只做一份阴性对照。

3.2.2.1.4 阳性对照 供试品无菌检查应进行阳性对照试验。不含抑菌剂或者经验证抑菌剂能够被冲洗液冲洗掉的生物制品, 以金黄色葡萄球菌作为阳性对照菌。供试品用量同供试品无菌检查每份培养基接种的样品量。阳性对照菌液试验的菌液制备同培养基灵敏度检查项下金黄色葡萄球菌菌液制备方法。加菌量小于 100CFU。阳性对照管置 30~35℃培养 72 小时, 菌体应生长良好。阳性对照也可以在供试品无菌检查培养 14 天后, 取其中 1 份硫乙醇酸盐流体培养基按规定送专业实验室检定, 作为阳性对照。每次试验都应该做阳性对照, 同一次试验对多批同企业、同品种、同规格的产品, 可以只做一份阳性对照。

3.2.2.2 直接接种法

3.2.2.2.1 无法采用薄膜过滤法进行无菌检查的供试品, 可采用直接接种法, 即取规定量的供试品分别接种至含硫乙醇酸盐流体培养基和胰酪大豆胨液体培养基的容器中。生物制品无菌检查时硫乙醇酸盐流体培养基和胰酪大豆胨液体培养基接种的瓶或支数为 2:1。除另有规定外, 每个容器中培养基的用量应符合接种的供试品体积不得大于培养基体积的 10%, 同时, 硫乙醇酸盐流体培养基每管装量不少于 15ml, 胰酪大豆胨液体培养基每管装量不少于 10ml。若供试品具有轻微抑菌作用, 可加入适量的无菌中和剂或灭活剂, 或加大每个容器的培养基用量。供试品检查时, 培养基的用量和高度同方法验证实验。

3.2.2.2.2 以无菌操作作用适宜的灭菌用具, 直接吸取规定量供试品 (或取以适宜方法制备的供试液管, 握拳以小指夹住培养基管的塞子, 拔开塞子, 以无菌操作吸取规定量供试液) 沿着培养基管壁分别接种于硫乙醇酸盐流体培养基和胰酪大豆胨液体培养基 (2 种培养基的接种支数或瓶数之比为 2:1), 各管接种后轻轻摇动, 置适宜温度培养 14 日, 培养 (培养温度同 3.2.2.1.2)。

3.2.2.2.3 阳性对照: 另接种一管硫乙醇酸盐流体培养基于操作结束后移至阳性菌室接种金黄色葡萄球菌阳性对照菌液 1ml (含菌小于 100CFU) 作为阳性对照。

3.2.2.2.4 阴性对照: 空白培养基作为阴性对照。阴性对照不得有菌生长。

3.2.3 培养及观察

3.2.3.1 培养期间应定时观察培养器并记录是否有菌生长, 若供试品管/瓶在培养检查时限内均澄清, 或虽显浑浊但经确证并无微生物生长, 则判断供试品符合规定。

3.2.3.2 如在加入供试品后或在培养过程中, 培养基出现浑浊, 培养 14 天后, 不能从外观上判断有无微生物生长, 可取该培养液适量转种至同种新鲜培养基中, 观察接种的同种新鲜培养基是否再出现浑浊; 或取原培养液涂片、镜检, 判断是否有菌。

3.2.3.3 如果复接种后培养基再次出现浑浊或镜检结果有菌, 均应定义为疑似阳性培养物, 应对疑似阳性培养物进行进一步的微生物学检测。必要时, 在供试品培养基出现浑浊时, 可无菌操作取少许浑浊培养液涂片, 染色, 镜检, 进行判断或以无菌操作取出浑浊内容物少许, 接种至相同体积和种类的培养基中, 置于相同培养条件下继续培养, 如上操作。若浑浊物量过低, 不足以完成如上操作, 则应继续培养, 待浑浊物扩增量可以完成如上操作。若继续培养浑浊物

没有出现扩增,或是将浑浊物复接种后培养基未出现再次浑浊,且该浑浊物经确认并非微生物,则判断供试品符合规定。

3.2.4 疑似阳性培养物的微生物学检测 将复接种后再次出现的疑似阳性培养物,划线接种至胰酪大豆胨琼脂培养基(TSA)或其他微生物鉴定用培养基表面,置相应温度培养18~24小时(必要时可延长培养时间)。观察并记录其菌落形态,挑取单个纯菌落进行革兰染色和镜检,观察并记录其染色特性及微生物形态学特征。必要时可作生化实验或使用菌种鉴定系统进一步鉴定该菌种。对已通过确认鉴定后的微生物可予以保藏。

4 结果与判定

4.1 供试品均澄清或虽浑浊但确证无菌生长,判定符合规定;若供试品中任何一瓶浑浊并确证有菌生长,判定不符合规定。阴性对照不得有菌生长。阳性对照应生长良好。

4.2 供试品管培养基在规定时限内出现的浑浊,需经如上操作确认浑浊物来源,除非能充分证明实验结果无效,即生长的微生物非来源于供试品,否则将判供试品不符合规定。当符合下列至少一个条件时,方可判断试验结果无效:

4.2.1 无菌检查试验所用的设备及洁净环境微生物监控结果不符合无菌检查法的要求。

4.2.2 回顾无菌试验过程,发现有可能引起微生物污染的因素。

4.2.3 供试品管中生长的微生物经鉴定后,确证是因无菌试验中所使用的物品和(或)无菌操作技术不当引起的。

试验若经确认无效,应重试。重试时,重新取同量供试品,依法检查,若无菌生长,判供试品符合规定;若有菌生长,判供试品不符合规定。

5 注意事项

5.1 试验前若使用成品培养基,确认所使用的该批培养基通过培养基的适用性检查,要求培养基瓶外加包装纸/袋。培养基的适用性检查也可与无菌检查同时进行。

5.2 成品培养基在其保质期内使用,保存期间,如发现硫乙醇酸盐流体培养基的氧化层超过1/5者,需加热驱氧,并冷却至45℃以下备用,只限加热一次。

5.3 洁净室浮游菌监测:根据洁净室的维护运行情况,每月至少进行1次采样测试,每个采样点一般采样一次。要求:A级: $<1\text{CFU}/\text{m}^3$;C级: $\leq 100\text{CFU}/\text{m}^3$ 。

5.4 动态沉降菌监测:每次无菌检查时均需进行动态沉降菌监测,要求结果均为阴性。

起草人:胡玥

复核人:王斌

异常毒性检查法

1 原理

异常毒性有别于药物本身所具有的毒性特征，是指由生产过程中引入的或其他原因所致的毒性。本法系给予动物一定剂量的供试品溶液，在规定时间内，观察动物出现的异常反应或死亡情况，检查供试品中是否污染外源性毒性物质以及是否存在意外的不安全因素。

2 材料和仪器

2.1 材料和试剂

2.1.1 供试品、实验用具 吸管、试管、注射器、移液器、合适的标记液或标记笔、医用酒精棉球。

2.1.2 实验动物 小鼠（体重 18~22g），豚鼠（体重 250~350g），均应为清洁级或以上。

2.2 仪器 电子天平。

3 操作方法

除另有规定外，异常毒性试验包括小鼠试验和豚鼠试验。

3.1 试验前的准备

3.1.1 在试验前实验动物应在试验环境下饲养适宜时间，即使之适应试验环境，又确保动物体重符合使用要求。并观察动物状况。

3.1.1.1 小鼠皮背光滑，无脱毛、松毛，四肢正常、运动活泼、无弓背，尾巴圆润，血管清晰，全身无肿胀、溃烂、眼睛明亮无异常，粪便正常等。

3.1.1.2 豚鼠发育良好，丰满匀称，敏捷活泼，无脱毛、松毛，无溃疡、脓肿，眼睛明亮无分泌物，鼻湿润无分泌物，无连续咳嗽，无连续抓鼻现象等。

3.1.2 供试品准备 注射前供试品须平衡至室温；如供试品为冻干制剂，需先按照说明书要求复溶；对于有特殊规定的制品，依据批准的药品标准中的规定溶解供试品。

3.2 小鼠试验

3.2.1 注射前标记小鼠，称取每只小鼠体重并记录。每批样品注射 5 只。

3.2.2 空白对照动物：以本次试验的同批 5 只小鼠为对照小鼠，对照小鼠不注射任何物质，但须在同等条件下饲养，并同试验组动物一起观测和记录。

3.2.3 注射：小鼠腹腔皮肤行医用酒精棉球消毒，充分摇匀样品并精确吸取，每只小鼠腹腔匀速或者缓慢注射 0.5ml（另有规定的按规定吸取样品量）。

3.2.4 观察：观察 7 天。

3.3 豚鼠试验

3.3.1 注射前标记动物，称取每只豚鼠体重并记录。每批样品注射 2 只。

3.3.2 空白对照动物：应以本次试验的同批豚鼠 2 只为对照动物，对照豚鼠不注射任何物质，但须在同等条件下饲养，并同试验组动物一起观测和记录。

3.3.3 注射：豚鼠腹腔皮肤行医用酒精棉球消毒，充分摇匀样品并精确吸取，每只豚鼠腹腔匀速或者缓慢注射 5.0ml（另有规定的按规定吸取样品量）。

3.3.4 观察：观察 7 天。

4 结果与判定

4.1 小鼠试验

4.1.1 观察期内，小鼠应全部健存，且无异常反应，到期时每只动物体重增加，则判定试验成立。

4.1.2 复试：如不符合上述要求，可用 10 只小鼠复试一次，方法和判定标准同 4.1.1，复试时的对照动物为 5 只。

4.2 豚鼠试验

4.2.1 观察期内，小鼠应全部健存，且无异常反应，到期时每只动物体重增加，则判定试验成立。

4.2.2 复试：如不符合上述要求，可用 4 只豚鼠复试一次，方法和判定标准同 4.2.1，复试时的对照动物为 2 只。

5 注意事项

5.1 腹腔注射方法：注射前，腹腔皮肤行 75%乙醇消毒，保持小鼠/豚鼠腹面朝上，头低尾高，取腹中线的一侧，使注射器针孔向上，针尖以小于 20° 的方向刺入皮下，贴腹壁向小鼠/豚鼠头部方向稍推进针头，穿过腹中线后在腹部的另一侧以 45° 方向进入腹腔，回抽确认没有刺入血管或肠道后匀速或缓慢推出药液。针尖先通过皮下然后再注入腹腔。

5.2 检验结果判定后，核对试验动物数量无误，将试验动物及时处死，装入清洁袋，按规定送至指定地点。



起草人：石继春 徐潇

复核人：叶强

热原检查法

1 原理

本法系将一定剂量的供试品，静脉注入家兔体内，在规定时间内，观察家兔体温升高情况，以判定供试品中所含热原的限度是否符合规定。

2 材料和设备

2.1 材料和试剂

2.1.1 供试品、注射器、烧杯、三角瓶、大称量瓶、吸管、移液管、表面皿、玻璃棒、广口试剂瓶、直镊、金属制密封器（均需除热原）、时钟、脱脂棉或细软卫生纸、75%乙醇、凡士林或50%甘油、0.9%氯化钠溶液和灭菌注射用水（经细菌内毒素检查，含细菌内毒素低于0.25EU/ml）。

2.1.2 实验动物

2.1.2.1 健康无伤、体重1.7kg以上（用于生物制品检测用家兔体重为1.7~3.0kg）、同一来源、同一品系、合格的实验用兔，雌兔应无孕，1兔1笼，标号号。

2.1.2.2 新兔预选

2.1.2.2.1 预测体温前7日，供试用的家兔即应用同一饲料饲养，在此期间，体重应不减轻，精神、食欲、排泄等不得有异常现象。

2.1.2.2.2 未曾用于热原检查用的家兔；或供试品判定为符合规定，但组内升温达0.6℃的家兔；或3周内未曾使用的家兔，均应在检查供试品7日内预测体温，进行挑选。挑选试验的条件与检查供试品相同，仅不注射药液。

2.1.2.2.3 测量体温时，测温探头插入肛门的深度各兔应相同，深度一般约6cm。

2.1.2.2.4 每隔30分钟测温1次，共测8次。

2.1.2.2.5 8次体温均在38.0~39.6℃的范围内，且最高最低体温相差不超过0.4℃的家兔，方可供热原检查用。

2.1.2.3 家兔的重复使用

2.1.2.3.1 如供试品判定为符合规定，至少应休息48小时后可再供热原检查用，其中升温达0.6℃的家兔应休息2周以上。

2.1.2.3.2 如供试品判定为不符合规定，则组内全部家兔不再使用。

2.1.2.3.3 对用于血液制品、抗毒素和其他同一抗原性供试品检测的家兔可在5天内重复使用1次。

2.2 仪器设备

2.2.1 热原测温仪，测温范围0~50℃，测温装置精密度为±0.1℃。

2.2.2 天平：分度值0.01mg或0.1mg（供试品称量用）；分度值0.1mg或1mg（试剂称量用）；分度值10g（家兔称重用）。

2.2.3 电热干燥箱，250℃以上，受热均匀。

2.2.4 家兔固定盒。

3 操作方法

3.1 试验前的准备

3.1.1 测温仪每6个月校验一次，如有异常随时校验，不符合要求者不能使用。

3.1.2 用具的除热原 清洗干净的玻璃器皿、注射器、针头、直镊等放入金属制容器内，密闭，置恒温干燥箱中经250℃30分钟以上加热除热原。控温时间应从达到规定温度时开始计时。去除热原未曾开启的密封容器内用具，可供一周内使用。

3.2 检查法

3.2.1 供试品准备

3.2.1.1 将待检供试品从外包装中取出后,用医用酒精棉球消毒容器表面。

3.2.1.2 如供试品为冻干制剂,需先按照说明书要求复溶;对于有特殊规定的制品,依据批准的药品标准中的规定溶解样品。

3.2.1.3 精密量取一定量药液。依据批准的药品标准中的规定浓度,加精密量取的一定量灭菌注射用水或无热原 0.9%氯化钠溶液,混匀。

3.2.2 取符合规定的家兔,在试验前至少 1 小时开始停止给饲料,称重后置于家兔固定盒内,头部固定应宽松适宜,直至试验完毕。

3.2.3 每隔 30 分钟测量家兔体温 1 次,一般测量 2 次,两次体温之差不得超过 0.2°C ,以此两次体温的平均值作为该兔的正常体温。

3.2.4 当日使用的家兔,正常体温应在 $38.0\sim 39.6^{\circ}\text{C}$ 范围内,且同组各兔间正常体温之差不得超过 1.0°C 。

3.2.5 每个供试样品用家兔 3 只,在测定正常体温后 15 分钟内给药。

3.2.6 供试品的剂量应按各该品种项下的规定注射。需缓慢注射的药液,注射速度(除另有规定外)一般为每兔 4~5 分钟,每分钟 4~8ml。

3.2.7 注射前先用 75% 乙醇棉球轻擦耳静脉的注射部位,从耳缘静脉耳尖端进针,缓缓注入。如进针不利,应顺序向前进行。

3.2.8 注射完毕,拔出针头时,按住针孔下端数秒钟,止血。

3.2.9 给药后每隔 30 分钟测量体温 1 次,共测 6 次。

4 结果计算

温差计算:注射药液后,以 6 次测得体温中最高的一次减去正常体温,即为该兔体温的升高温度 ($^{\circ}\text{C}$),计算 3 只家兔体温升高总和。当家兔升温为负值时,均以 0°C 计。

5 结果判定

5.1 判断复试 初试 3 只家兔中仅有 1 只体温升高 0.6°C 或高于 0.6°C ,或 3 只家兔升温均低于 0.6°C 但升温的总数达 1.3°C 或高于 1.3°C ,应另取 5 只家兔复试(检查方法同上)。

5.2 判断合格

5.2.1 在初试的 3 只家兔中,体温升高均低于 0.6°C ,并且 3 只家兔升温总和低于 1.3°C ,均判定供试品的热原检查符合规定。

5.2.2 在复试的 5 只家兔中,体温升高 0.6°C 或高于 0.6°C 的家兔不超过 1 只,并且初试、复试合并 8 只家兔的体温升高总和为 3.5°C 或低于 3.5°C ,均判定供试品的热原检查符合规定。

5.3 判断不合格

5.3.1 在初试的 3 只家兔中,体温升高 0.6°C 或高于 0.6°C 的家兔超过 1 只,判断供试品的热原检查不符合规定。

5.3.2 在复试的 5 只家兔中,体温升高 0.6°C 或高于 0.6°C 的家兔超过 1 只,判定供试品的热原检查不符合规定。

5.3.3 在初试、复试合并 8 只家兔的升温总和超过 3.5°C ,判定供试品的热原检查不符合

规定。

6 注意事项

- 6.1 实验室和饲养室的温度应在 17~25℃ 范围内。
- 6.2 实验室与饲养室的温度相差不得大于 3℃。
- 6.3 试验全过程中，室温变化不得大于 3℃，空调风口不应直对实验动物。
- 6.4 供试品或稀释供试品的无热原稀释液，在注射前应预热至约 38℃。

起草人：石继春 徐潇

复核人：叶强

细菌内毒素检查法

细菌内毒素检查有两种方法，即凝胶法和光度测定法，后者包括浊度法和显色基质法。供试品检测时，可使用其中任何一种方法进行试验。当测定结果有争议时，除另有规定外，以凝胶限度试验结果为准。

方法一：凝胶法

1 原理

通过鲎试剂与内毒素产生凝集反应进行限度检测或半定量检测内毒素。

2 材料和设备

2.1 材料

2.1.1 试验用具 移液管（或刻度吸管、微量加样器及无热原吸头）、凝集管（10mm×75mm）、试管、试管架、洗耳球、封口膜、时钟、医用酒精棉球、剪刀、砂轮。

试验所用的器皿需经过处理，以去除可能存在的外源性内毒素。耐热器皿常用干热灭菌法 250℃、30 分钟以上去除，也可采用其他确证不干扰细菌内毒素检查的适宜方法。若使用塑料器具，如微孔板和与微量加样器配套的吸头等，应选用标明无内毒素并且对试验无干扰的器具。

2.1.2 试药与试剂

2.1.2.1 细菌内毒素国家标准品或细菌内毒素工作标准品，除另有规定外，应使用由中国食品药品检定研究院统一发放的标准品。

2.1.2.2 细菌内毒素检查用水，应符合灭菌注射用水标准，其内毒素含量小于 0.015EU/ml，且对内毒素试验无干扰作用。

2.1.2.3 鲎试剂,在首次使用前应通过鲎试剂灵敏度复核试验,符合规定方可使用。

2.2 设备 天平(分度值为0.1mg以下),电热干燥箱(温度应能达到250℃),恒温水浴箱或适宜的恒温器(37℃±1℃),旋涡混合器。

3 操作方法

3.1 鲎试剂灵敏度复核试验 当使用新批号的鲎试剂或试验条件发生了任何可能影响检验结果的改变时,应进行鲎试剂灵敏度复核试验。

3.1.1 细菌内毒素标准溶液的制备 根据鲎试剂灵敏度的标示值(λ),将细菌内毒素国家标准品或工作标准品用细菌内毒素检查用水溶解,用封口膜将瓶口封严,在旋涡混合器上混匀15分钟,然后制成2 λ 、 λ 、0.5 λ 和0.25 λ 四个浓度的内毒素标准溶液,每稀释一步均应在旋涡混合器上混合30秒钟。

若使用的为细菌内毒素国家标准品,可按其使用说明书将其稀释至规定浓度后分装、保存。若为细菌内毒素工作标准品,为一次性使用。

3.1.2 待复核鲎试剂的准备 取规格为0.1ml/支的鲎试剂18支,每支加入0.1ml检查用水溶解,轻轻转动瓶壁,使内容物充分溶解,避免产生气泡。若待复核鲎试剂的规格不是0.1ml/支时,取若干支按其标示量加入检查用水复溶,充分溶解后将鲎试剂溶液混和在一起,然后每0.1ml分装到10mm×75mm凝集管中,要求分装18管备用。

3.1.3 加样 2 λ 、 λ 、0.5 λ 、0.25 λ 的内毒素标准溶液每一浓度加4支凝集管;另取2支(管)加入检查用水作为阴性对照。加样体积均为0.1ml。

3.1.4 保温 加样结束后,将鲎试剂用封口膜封口,轻轻振动混匀,避免产生气泡,垂直放入37℃±1℃水浴或适宜恒温器中,保温60分钟±2分钟。

3.1.5 观察并记录结果 将每管拿出缓缓倒转180°观察,若管内形成凝胶,并且凝胶不变形,不从管壁滑脱者为阳性,记录为(+);未形成凝胶或形成的凝胶不坚实、变形并从管壁滑脱者为阴性,记录为(-)。

3.1.6 试验结果计算 当最大浓度2 λ 的4管均为阳性,最低浓度0.25 λ 的4管均为阴性,阴性对照管为阴性,试验方为有效。

按下式计算反应终点浓度的几何平均值即为鲎试剂灵敏度的复核结果(λ_c):

$$\lambda_c = \text{antilg}(\sum X/n)$$

式中 X为反应终点浓度的对数值(lg)。反应终点浓度是指系列递减的内毒素标准溶液中最后一个呈阳性结果的浓度;

n为每个浓度的平行管数。

3.1.7 结果判断 当 λ_c 在0.5 λ ~2 λ (包括0.5 λ 和2 λ)时,方可用于细菌内毒素检查,并以标示灵敏度 λ 为该批鲎试剂的灵敏度。

3.2 干扰试验 干扰试验的目的是确定供试品在多大的稀释倍数或浓度下对内毒素和鲎试剂的反应不存在干扰作用,为能否使用细菌内毒素检查法提供依据。并且验证当供试品的配方和工艺有变化,鲎试剂来源改变或供试品阳性对照结果呈阴性时供试品是否存在干扰作用。

建议使用较低灵敏度(如0.5或0.25EU/ml)的鲎试剂进行干扰试验的预试验,可尽量避免供试品所含的内毒素对干扰试验造成的阳性影响。正式干扰试验时,应尽量选择不干扰稀释倍数或浓度对应灵敏度的鲎试剂进行试验。

3.2.1 干扰试验预试验 预试验的目的是初步确定供试品的最大不干扰浓度(当限值以

EU/mg 或 EU/U 活性单位表示) 或最小不干扰稀释倍数(当限值以 EU/ml 表示), 为正式干扰试验提供依据。

3.2.1.1 将无可检测到内毒素的供试品进行一系列倍数的稀释, 但最大的稀释倍数一般不得超过 $MVD = c \cdot L / \lambda_{0.03}$ 。

3.2.1.2 使用鲎试剂对每一稀释倍数进行检验。每一稀释倍数下做 2 支供试品管和 2 支供试品阳性对照(即用该浓度的供试品稀释液将内毒素标准品制成 2λ 浓度)。另取 2 支加入细菌内毒素检查用水作为阴性对照, 2 支加入 2λ 浓度的内毒素标准溶液作为阳性对照。保温 60 分钟 \pm 2 分钟后, 观察并记录结果。

3.2.1.3 当阴性对照为阴性, 阳性对照为阳性时, 试验为有效。当系列浓度中出现供试品溶液 2 管为阴性, 供试品阳性对照 2 管为阳性时, 认为供试品在该浓度下不干扰试验, 此稀释倍数即为最小不干扰稀释倍数。即可选择该稀释倍数进行正式干扰试验。

当系列浓度中所有浓度的供试品管都不为阴性, 或供试品阳性对照管不为阳性时, 说明供试品对内毒素与鲎试剂的反应存在干扰, 则应对供试品进行更大倍数稀释(不得超过 $MVD = c \cdot L / \lambda_{0.03}$), 或通过其他适宜的方法(如过滤、中和、透析或加热处理等)排除干扰。为确保所选择的处理方法能有效地排除干扰且不会使内毒素失去活性, 要使用预先添加了标准内毒素再经过处理的供试品溶液作为供试品阳性对照进行干扰试验。

当供试品的内毒素限值单位为 EU/mg 或 EU/U 时, 应将最小不干扰稀释倍数换算成最大不干扰浓度(即该稀释倍数下溶液的浓度), 以 mg/ml 或 U/ml 表示。

3.2.2 干扰试验 目的是检验在某一浓度下的供试品对于鲎试剂与内毒素的反应有无干扰作用。

3.2.2.1 制备内毒素标准对照溶液 取 1 支细菌内毒素标准品, 用细菌内毒素检查用水稀释成 4 个浓度的标准溶液即 2λ 、 λ 、 0.5λ 、 0.25λ (方法同 3.1.1)。

3.2.2.2 制备含内毒素的供试品溶液 将供试品稀释至预试验中确定的不干扰稀释倍数, 再用此稀释液将 3.2.2.1 中的同一支细菌内毒素标准品稀释成 4 个浓度即 2λ 、 λ 、 0.5λ 、 0.25λ 的含内毒素的供试品溶液。

3.2.2.3 鲎试剂的准备 按 3.1.2 方法准备鲎试剂 28 支。

3.2.2.4 加样 将准备好的 28 支鲎试剂放在试管架上。将 2λ 、 λ 、 0.5λ 、 0.25λ 的内毒素标准溶液每一浓度加 2 管, 另取 2 管加入检查用水作为阴性对照。将含 2λ 、 λ 、 0.5λ 、 0.25λ 的内毒素的供试品溶液每一浓度加 4 管, 另取 2 管加入供试品溶液作为样品阴性对照。加样体积均为 0.1ml。

3.2.2.5 保温 加样结束后, 将鲎试剂用封口膜封口, 轻轻振动混匀, 避免产生气泡, 垂直放入 $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 水浴或适宜恒温器中, 保温 60 分钟 \pm 2 分钟。

3.2.2.6 结果判断 只有当阴性对照和样品阴性对照溶液的所有平行管都为阴性, 并且内毒素标准系列的结果在鲎试剂灵敏度复核范围内时, 试验方为有效。当供试品系列的结果符合鲎试剂灵敏度复核试验的要求时, 即最大浓度 2λ 4 管均为阳性, 最低浓度 0.25λ 4 管均为阴性时, 认为供试品在该浓度下无干扰作用。

其他情况则认为供试品在该浓度下干扰试验。应使用适宜方法排除干扰, 如对供试品进行更大倍数的稀释, 是排除干扰因素的简单有效方法。

3.3 凝胶限度试验

3.3.1 供试品溶液的制备

3.3.1.1 按下式计算供试品的最大有效稀释倍数 (MVD):

$$MVD = c \cdot L/\lambda$$

式中 L 为供试品的细菌内毒素限值;

c 为供试品溶液的浓度, 当 L 以 EU/mg 或 EU/U 表示时, c 的单位为 mg/ml 或 U/ml, 当 L 以 EU/ml 表示时, 则 c 等于 1.0ml/ml。如需计算在 MVD 时的供试品浓度, 即最小有效稀释浓度 (c), 可使用公式: $c = \lambda/L$;

λ 为在凝胶法中鲎试剂的标示灵敏度 (EU/ml)。

3.3.1.2 将供试品进行稀释, 其稀释倍数不得超过 MVD。

3.3.2 阳性对照溶液的制备 用检查用水将标准品稀释制成 2λ 浓度的内毒素标准溶液(方法同 3.1.1)。

3.3.3 供试品阳性对照溶液的制备 用待检测的供试品溶液或其稀释液将内毒素标准品制成 2λ 浓度的内毒素溶液。

3.3.4 阴性对照液 即细菌内毒素检查用水。

3.3.5 鲎试剂的准备 取复溶后规格为 0.1ml/支或分装好的鲎试剂 8 管备用。

3.3.6 加样 其中 2 支加入 0.1ml 供试品溶液或其稀释液(其稀释倍数不得超过 MVD)作为供试品管, 2 支加入 0.1ml 阳性对照溶液作为阳性对照管 (PC), 2 支加入 0.1ml 检查用水作为阴性对照 (NC), 2 支加入 0.1ml 供试品阳性对照溶液作为供试品阳性对照管 (PPC)。

3.3.7 将管中溶液轻轻混匀后, 用封口膜封闭管口, 垂直放入 $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 水浴或适宜恒温器中, 保温 60 分钟 ± 2 分钟。

3.3.8 结果判断 当阳性对照都为阳性、供试品阳性对照都为阳性且阴性对照都为阴性时, 试验方为有效。若供试品 2 管均为阴性, 认为该供试品符合规定。当供试品的稀释倍数等于 MVD 时结果出现供试品 2 管均为阳性, 应认为不符合规定; 如 2 管中 1 管为阳性, 1 管为阴性, 按上述方法另取 4 支供试品管复试, 4 管中如有 1 管为阳性, 即认为不符合规定。若供试品的稀释倍数小于 MVD 而结果出现 2 管均为阳性或 2 管中 1 管为阳性时, 按同样方法将其稀释至 MVD 重新试验, 再对结果进行判断。

3.3.9 注意事项 在细菌内毒素检查中, 每批供试品必须做 2 支供试品管和 2 支供试品阳性对照, 同时每次试验须做 2 支阳性对照和 2 支阴性对照。

3.4 凝胶半定量试验 半定量试验是使用凝胶法估测供试品中内毒素含量的方法, 系利用供试品系列与鲎试剂反应的终点浓度计算出供试品中内毒素的含量。

3.4.1 供试品系列的制备 用检查用水将供试品溶液从已确定的不干扰浓度或稀释倍数下开始进行对倍稀释, 制备成 2、4、8 等 N 个浓度, 但最大稀释倍数不得超过所使用鲎试剂的 MVD。N 可根据试验设计不同确定。

3.4.2 内毒素标准系列的制备 用检查用水将内毒素标准品稀释成 4 个浓度的标准溶液即 2λ 、 λ 、 0.5λ 、 0.25λ 。

3.4.3 供试品阳性对照溶液的制备 用已确定不干扰浓度或稀释倍数的供试品溶液将内毒素标准品制成 2λ 浓度的内毒素溶液。

3.4.4 阴性对照液 即细菌内毒素检查用水。

3.4.5 鲎试剂的准备 取规格为 0.1ml/支或分装好的鲎试剂 12+2N 支, 其他准备按干扰试验项下的“鲎试剂准备”。

3.4.6 加样 将准备好的鲎试剂取其中 10 支（管）放在试管架上，排成 5 列，每列 2 支。其中 4 列每列每支分别加入 0.1ml 的 2λ 、 λ 、 0.5λ 、 0.25λ 的内毒素标准溶液，另一列 2 支（管）加入 0.1ml 检查用水作为阴性对照。

另外 $2n$ 支（管）鲎试剂，每 2 支分别加入 0.1ml 一个浓度的供试品溶液。

另 2 支（管）加入 0.1ml 供试品阳性对照溶液作为样品阳性对照。

3.4.7 将试管中溶液轻轻混匀后，保温 60 分钟 \pm 2 分钟。

3.4.8 试验结果计算 如内毒素标准系列最大浓度 2λ 均为阳性，最低浓度 0.25λ 均为阴性，阴性对照均为阴性，供试品阳性对照为阳性时，按下式计算内毒素标准溶液的反应终点浓度的几何平均值（ λ_t ）和供试品溶液每一系列反应终点浓度 c 。

$$\lambda_t = \text{antilg} (\Sigma X_i / 2)$$

$$c = D \times \lambda$$

式中， X_i 为内毒素溶液的反应终点浓度的对数值（lg）。 c 为每个系列的反应终点浓度，即每一系列平行管的终点稀释倍数 D 乘以鲎试剂标志灵敏度 λ 。如果检验的是稀释过的供试品，则将终点浓度乘以供试品进行半定量试验的初始稀释倍数，即得到每一系列的内毒素浓度 c 。

如一个系列中供试品溶液的结果都为阴性，应记为内毒素浓度 c 小于 λ （如果检验的是稀释过的供试品，则记录为小于 $\lambda \times$ 该供试品的最低稀释倍数）。如果结果都为阳性，应记为内毒素的浓度 c 大于或等于最大的稀释倍数乘以 λ 。

3.4.9 结果判断 当 λ_t 在 $0.5\lambda \sim 2\lambda$ 之间，试验方为有效。

若每一系列内毒素浓度 c 均小于规定的限值，判定供试品符合规定。供试品溶液的内毒素浓度为每一系列内毒素浓度的几何平均值，即按公式 $c_g = \text{antilg} (\Sigma \lg c / 2)$ 计算。

若任何系列内毒素浓度不小于规定的限值，则判定供试品不符合规定。不必计算供试品的内毒素浓度。

方法二：光度法

1 原理

光度测定法分为浊度法和显色基质法。

浊度法系利用检测鲎试剂与内毒素反应过程中浊度变化而测定内毒素含量的方法。根据检测原理，可分为终点浊度法和动态浊度法。终点浊度法是依据反应混合物中的内毒素浓度和其在孵育终止时的浊度（吸光度或透光率）之间存在着量化关系来测定内毒素含量的方法。动态浊度法是检测反应混合物的浊度到达某一预先设定的吸光度或透光率所需要的反应时间，或是检测浊度增加速度的方法。

显色基质法系利用检测鲎试剂与内毒素反应过程中产生的凝固酶使特殊底物显色释放出的有色团的多少而测定内毒素含量的方法。根据检测原理，分为终点显色法和动态显色法。终点显色法是依据反应混合物中的内毒素浓度和其在孵育终止时释放出的有色团的量之间存在的量化关系来测定内毒素含量的方法。动态显色法是检测反应混合物的吸光度或透光率达到某一预先设定的吸光度或透光率所需要的反应时间，或是检测值增加速度的方法。

2 材料和设备

2.1 材料

2.1.1 细菌内毒素国家标准品或细菌内毒素工作标准品,除另有规定外,应使用由中国食品药品检定研究院统一发放的标准品。

2.1.2 细菌内毒素检查用水,应符合灭菌注射用水标准,其内毒素含量小于 0.005EU/ml,且对内毒素试验无干扰作用。

2.1.3 鲎试剂,在首次使用前应通过标准曲线可靠性验证试验,符合规定方可使用。

2.2 设备 细菌内毒素光度测定仪器,或分光光度计。

浊度法分为终点浊度法和动态浊度法,显色基质法也分为终点显色法和动态显色法。针对不同的方法,应配置相应的测定仪器。

3 操作方法

3.1 仪器的设置 在试验开始前,应根据仪器的说明和试验的设计设定反应时间,反应温度(一般为 $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$),检测波长等相关系数。

供试品和鲎试剂的分装加样量、供试品和鲎试剂的比例以及保温时间等,需参照所用仪器和试剂的有关说明进行。

3.2 标准曲线的可靠性试验 当使用新批号的鲎试剂或试验条件发生了任何可能会影响检验结果的改变时,需进行标准曲线的可靠性试验。

3.2.1 细菌内毒素标准溶液的制备 用检查用水将一支内毒素标准品溶解稀释,并制成至少 3 个浓度的稀释液(相邻浓度间稀释倍数不得大于 10),最低浓度不得低于所用鲎试剂的标示检测限。稀释操作方法同凝胶法。

3.2.2 鲎试剂的准备 要求内毒素标准系列中每一浓度至少做 3 支平行管,并要求同时做 2 支阴性对照。根据所制备的标准曲线中浓度的个数来计算所需要的鲎试剂体积。

由于凝胶法鲎试剂和光度测定法鲎试剂在工艺上有所不同,因此在进行光度法检测时需使用专用鲎试剂而不能凝胶法鲎试剂代替。光度法鲎试剂都为 0.5ml 以上装量,在溶解后需将所有鲎试剂混合在一起,备用。

3.2.3 加样 将标准内毒素溶液和阴性对照按仪器要求的体积分装到仪器配置的反应容器中,如小试管或微孔板。再加入要求体积的鲎试剂,轻轻混匀,避免产生气泡,然后将反应容器放入光度测定仪中进行反应。

3.2.4 结果判断 当阴性对照内毒素的检测值小于标准曲线最低点的检测值或反应时间大于标准曲线最低点的反应时间,将全部数据进行线性回归分析。根据线性回归分析,标准曲线的相关系数(R)的绝对值应大于或等于 0.980,试验方为有效。否则须重新试验。

3.3 干扰试验 干扰试验的目的同凝胶法干扰试验。当鲎试剂、供试品的来源、配方、生产工艺改变或试验环境中发生了任何有可能影响试验结果的变化时,须重新进行干扰试验。

3.3.1 标准溶液的制备 操作同 3.2.1。

3.3.2 将供试品进行一系列的稀释,但不得超过 MVD。选择标准曲线中点或一个靠近中点的内毒素浓度,设为 λ_m ,作为添加到供试品中的标准内毒素浓度。

3.3.3 鲎试剂的准备 根据标准曲线及供试品浓度个数来计算所需要的鲎试剂体积。鲎试剂溶解后需将所有试剂混合在一起,备用。

3.3.4 加样 标准曲线每个浓度不少于 2 支平行管，供试品每个浓度不少于 2 支平行管，同时供试品每个浓度的样品阳性对照也不少于 2 支平行管。并用检查用水做 2 支阴性对照。

3.3.5 试验结果计算 当反应完毕后，仪器自动生成标准曲线并按所得线性回归方程分别计算出供试品溶液和含标准内毒素的供试品溶液的内毒素含量 c_t 和 c_s ，按下式计算供试品每一浓度的回收率（R）。

$$R = (c_s - c_t) / \lambda_m \times 100\%$$

3.3.6 结果判断 当阴性对照的检测值小于标准曲线最低点的检测值或反应时间大于标准曲线最低浓度的反应时间，标准曲线的相关系数（R）的绝对值应大于或等于 0.980，试验有效。

当供试品的内毒素的回收率在 50%~200%之间时，则认为在此浓度下供试品溶液不存在干扰作用。

当供试品系列的内毒素的回收率都不在指定的范围内，可重新制备比最低浓度（ λ ）更低的标准曲线，从而提高 MVD，将供试品进行更大倍数的稀释来排除干扰。或按“凝胶法干扰试验”中提及的其他适宜方法去除干扰因素，并要重复干扰试验来验证处理的有效性。

3.4 供试品细菌内毒素检查

3.4.1 标准溶液的制备 操作同 3.2.1。

3.4.2 将供试品稀释至一个已证实无干扰作用的浓度，并同时制备该浓度下的供试品阳性对照。

3.4.3 鲎试剂的准备及加样 标准曲线每个浓度不少于 2 支平行管，供试品不少于 2 支平行管，供试品阳性对照也不少于 2 支平行管。并用检查用水做 2 支阴性对照。

将标准内毒素溶液、供试品、供试品阳性对照和阴性对照按仪器要求的体积分装到仪器配置的反应容器中，再将鲎试剂也按要求的体积加入到反应容器中，轻轻混匀，避免产生气泡，然后将反应容器放入光度测定仪中进行反应。

3.4.4 结果判断 当反应完毕后，使用标准曲线来计算供试品的每一个平行管的内毒素浓度。

试验必须符合以下三个条件方为有效：

3.4.4.1 标准曲线的结果要符合“标准曲线的可靠性试验”中的要求。

3.4.4.2 该浓度下的内毒素回收率要在 50%~200%的范围内。

3.4.4.3 阴性对照的检测值小于标准曲线最低点的检测值或反应时间大于标准曲线最低点的反应时间。

若供试品溶液所有平行管的平均内毒素浓度乘以稀释倍数后，小于规定的内毒素限值，判供试品符合规定。若大于或等于规定的内毒素限值，判供试品不符合规定。

4 注意事项

4.1 实验操作应在清洁环境中进行，过程中应防止内毒素的污染。

4.2 在使用洗耳球、移液管取样时，应注意不要将洗耳球中的气体吹入溶液中，以防止气体中的内毒素进入供试液。

4.3 溶解鲎试剂及混匀供试品和鲎试剂时，不要剧烈振荡避免产生气泡。

4.4 由于凝胶法的凝集反应是不可逆的，所以在保温反应过程中及观察结果拿取时应注意不要使试管受到振动，以免使凝胶破碎产生假阴性结果。

4.5 进行干扰实验时，标准对照系列和含内毒素的供试品溶液系列应同时进行。

4.6 在进行鲎试剂灵敏度复核、干扰实验和供试品细菌内毒素检查时，各个实验中要求的对照应同时进行，并在实验有效的情况才能进行计算和判断。

4.7 有些供试品在使用非简化法制备供试品阳性对照时结果是存在干扰作用的，但是如果使用简化法则结果表现为无干扰，说明使用简化法会掩盖供试品的干扰作用，这样的供试品不适合使用简化法。供试品阳性对照能否采用简化法，应根据具体品种进行验证。

4.8 玻璃器皿的洗涤 将玻璃器皿放入铬酸洗液或其他热原灭活剂或清洗液中充分浸泡，然后取出将洗液空干，用自来水将残留洗液彻底洗净，再用蒸馏水反复冲洗三遍以上，空干后放入适宜的密闭金属容器中或用锡箔纸包好后再放入金属容器内，放置入烤箱。耐热器皿外源性内毒素的去除 将洁净干燥的器皿放入适宜的密闭金属容器中或用锡箔纸包好后再放入金属容器内，放置入电热干燥箱。将干燥箱调至 250℃，待干燥箱温度升至设定的温度后开始计时，250℃干烤 30 分钟以上。达到规定时间后，关闭电源待干燥箱温度自然将至室温后使用。

4.9 供试品溶液的制备 某些供试品需进行复溶、稀释或在水性溶液中浸提制成供试品溶液。一般供试品溶液和鲎试剂混合后溶液的 pH 值在 6.0~8.0 的范围内为宜。对于过酸、过碱或本身有缓冲能力的供试品，需调节被测溶液（或其稀释液）的 pH 值至 6.0~8.0 的范围内，可使用酸、碱溶液或适宜的缓冲液调节 pH 值。酸或碱溶液须用细菌内毒素检查用水在已去除内毒素的容器中配制。缓冲液必须经过验证不含内毒素和干扰因子。

4.10 在建立品种的细菌内毒素检查法时，为验证样品和不同鲎试剂反应的一致性，要求同时使用两个生产厂家的鲎试剂对至少三批样品进行干扰试验。如为上市品种建立统一的细菌内毒素检查法，应检测两个以上生产厂家的样品（独家上市品种除外）；如为新药需检测连续生产的样品。样品的限值应依据《中国药典》通则 1143 中的公式计算后确定。

起草人：蔡彤（中国食品药品检定研究院）

复核人：李鸣（福建省食品药品质量检验研究院）

刘宁（江西省药品检验检测研究院）

洗静雯（深圳市药品检验研究院）

等电点测定法

1 原理

在电泳介质中加入两性电解质载体，在直流电场中，两性电解质载体即形成一个由阳极到阴极逐步增加的 pH 梯度，正极附近是低 pH 区，负极附近是高 pH 区。在此体系中，蛋白质分子在不同 pH 下的解离状态不同，带上不同性质和数量的电荷，在电场力作用下向着一定方向移动，当移动到其等电点位置上，蛋白质分子呈电中性，不再迁移。即被聚焦于一个狭的区带中，这种电泳技术称为等电聚焦电泳。该方法常用于蛋白质、多肽等的等电点测定及电荷异质性评价。

2 材料和设备

2.1 试剂

2.1.1 水：电阻率应不低于 $18.2\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$ 。

2.1.2 A 液：称取丙烯酰胺 29.1g，甲叉双丙烯酰胺 0.9g，加适量水溶解，并稀释至 100ml，双层滤纸滤过，避光保存。

2.1.3 B 液（10%过硫酸铵）：称取 100mg 过硫酸铵（AP），加水溶解至 1ml，临用新制。

2.1.4 固定液：称取三氯醋酸 34.5g、磺基水杨酸 10.4g，加水溶解并稀释至 300ml。置于棕色玻璃瓶中，室温保存。

2.1.5 脱色液（平衡液）：量取 95%乙醇 500ml、冰醋酸 160ml，加水稀释至 2000ml。置于玻璃瓶中，室温保存。

2.1.6 染色液：称取考马氏亮蓝 G250（或 R250）0.35g，加脱色液 300ml，在 $60\sim 70^\circ\text{C}$ 水浴中加热，使溶解。置于棕色玻璃瓶中，室温保存。

2.1.7 保存液：量取甘油 30ml，加脱色液 300ml，混匀。置于玻璃瓶中，室温保存。

2.1.8 正极液（0.5mol/L 磷酸溶液）：量取磷酸 50ml，加水至 1800ml。置于棕色玻璃瓶中， 4°C 保存。

2.1.9 负极液（0.2mol/L 氢氧化钠溶液）：称取氢氧化钠 8g，加水溶解并稀释至 1000ml。置于棕色玻璃瓶中， 4°C 保存。

2.1.10 预电泳缓冲液：两性电解质溶液（pH 3~10，浓度 40%）2ml，甘油 6ml，0.1% 甲基红 2ml，混匀分装在小离心管中， 4°C 保存。

2.1.11 供试品缓冲液（4 倍浓度）：取甘油 8ml、40%两性电解质（pH 3~10）溶液 4ml，加水至 20ml。加 0.1% 甲基红溶液 $20\mu\text{l}$ 。

2.1.12 等电聚焦标准蛋白：根据所使用的两性电解质范围选择合适的等电聚焦标准蛋白。

2.2 设备 电泳槽，电泳仪，摇床，凝胶扫描分析仪。

3 操作方法

3.1 安装好电泳仪，调试正常。

3.2 取 A 液 6.25ml，pH 3~10 两性电解质（或其他两性电解质）1.5ml，水 17.1ml，抽气 5~10 分钟，加 B 液 175 μ l，N,N,N',N'-四甲基乙二胺 20 μ l，混匀后缓慢地注入水平模具内，室温下聚合。

3.3 将已聚合的聚丙烯酰胺凝胶放在冷却板上，其间涂以液体石蜡或煤油并避免产生气泡。

3.4 用正极液与负极液分别润湿正极与负极电极条，然后分别放于阳极与阴极上，将加样滤纸放在凝胶上。

3.5 将供试品对水透析（或用其他方法）脱盐，并使蛋白质含量调节至每 1ml 含 0.5mg 以上（如供试品蛋白浓度太低，则需采用适当方法浓缩），对等电聚焦标准蛋白做相同处理。

3.6 加预电泳缓冲液 20 μ l 在 10 $^{\circ}$ C，200V（~10mA）条件下进行预电泳 30 分钟。

3.7 加供试品溶液 5~30 μ l。将电极对准电极条的中心，加盖，在上限电压 2000V、上限电流 50mA、功率 1W/cm 胶、温度 4 $^{\circ}$ C 的电泳条件下，开始电泳，电泳 2.5 小时，同时做等电聚焦标准蛋白（在电泳 30 分钟后去掉加样滤纸）。

3.8 固定：电泳结束后取下电泳后的凝胶，置于固定液中，用摇床摇动浸泡 20 分钟以上。

3.9 平衡：取出固定后的凝胶，置于平衡液中，用摇床摇动浸泡 20~30 分钟。

3.10 染色：取出平衡后的凝胶，置于染色液中，用摇床摇动染色 40~60 分钟。

3.11 脱色：取出染色后的凝胶，置于脱色液中，用摇床摇动洗脱，不断更换新鲜的脱色液，直至凝胶底色背景近于无色为止。

3.12 保存：取出脱色后的凝胶放入保存液中 30 分钟，凉干。亦可做成干胶永久保存。

4 计算

凝胶完成显色处理完毕后，对其进行拍照或扫描，通常采用商品化的带有数据分析软件的凝胶扫描系统。

供试品主成分迁移距离应与对照品一致，以各标准品的等电点（pI）对其相应的迁移距离作线性回归，所得标准线性方程应 $R^2 \geq 0.95$ 。将供试品的迁移距离代入线性回归方程，求出供试品的等电点。

5 结果与判定

供试品主成分迁移距离应与对照品一致，供试品等电点应符合批准的要求。

6 注意事项

6.1 供试品中含有盐可能会产生问题，在保证供试品稳定前提下最好脱盐处理。不同供试品特性不同，可能需要在凝胶中加入尿素等改善分离度。

6.2 为保护蛋白质免受极端 pH 环境的影响，点样位置不应过于靠近电极区域。

6.3 等电聚焦期间产生大量热量，应采取必要的冷却装置，并将凝胶冷却温度设置至 10 $^{\circ}$ C。

起草人：李响 秦玺

复核人：饶春明 周勇

N 端氨基酸序列测定法

1 原理

通过在蛋白质/多肽的主链 α -氨基连接异硫氰酸苯酯,活化其 N 端第一与第二氨基酸残基间肽键,然后利用无水三氟乙酸将 N 端第一氨基酸残基从主链上裂解下来,随后对裂解下的氨基酸残基衍生物进行定量检测。循环往复即可测定蛋白质/多肽 N 端序列。

2 材料和设备

2.1 材料 异硫氰酸苯溶液、三甲胺溶液、三氟乙酸、25%三氟乙酸、乙酸乙酯、氯丁烷、37%乙腈溶液、聚凝胺和玻璃膜,高纯氮气。

2.2 仪器设备 蛋白质/多肽 N 端氨基酸序列测定仪。

3 操作方法

3.1 用纯水配制 100ng/ μ l 的聚凝胺溶液,15 μ l/支分装并-20 $^{\circ}$ C 冻存(保存期 2 个月),取 15 μ l 加于玻璃膜上,干燥 10 分钟,并运行预处理程序约 2.5 小时;或者使用 PVDF 膜。

3.2 供试品特殊处理:按供试品具体要求进行。一般取 200 μ l 供试品,使用 500ml 纯水透析 3 小时;上样量 100pmol 干燥 10 分钟;应用蛋白质 N 端测序仪标准测序方法,测定 N 端 15 个氨基酸。

3.3 操作步骤

3.3.1 系统启动

3.3.1.1 系统启动打开 SPD-M30A 和 PPSQ-53A 的电源,打开电脑,输入密码。

3.3.1.2 进入系统后,再进入<LabSolution>。

3.3.1.3 N_2 气供给:关闭减压阀的分压阀,打开减压阀的主压阀,慢慢的打开分压阀,调节分压压力为 2kgf/cm²(或 0.2MPa)。执行<PPSQ-53A>窗口中的[Maintenance] [Purge Gas Tubing] [ON],持续 30 到 40 秒后,执行[OFF] [Close]。

3.3.1.4 进入<LCsolution>窗口,等待<Real Time Analysis>窗口转为 LC Ready。

3.3.1.5 执行 LC-20AT 改变模式为“remote”。

3.3.1.6 选择<Real Time Analysis>窗口中的[LC Monitor]检查流量、压力、温度。

3.3.1.7 选择<Real Time Analysis>窗口中的[Zero Ch1] [Test/Zero]调节基线。

3.3.2 氨基酸标准分析

3.3.2.1 在<Real Time Analysis>窗口中检查 HPLC 在正常状态下稳定。

3.3.2.2 清理管路,执行<PP53-A>窗口“Loop Wash”。

3.3.2.3 上一步执行后,除去样品管,用乙腈清洗烘干。将氨基酸标准调至室温。取 100 μ l 加入样品管。

3.4 上样

3.5 校正 HPLC 系统 选择<Real Time Analysis>窗口中的打开 LC Analysis。

3.6 打开<Quantitation>窗口中的[Edit][Quantitation...][OK]; 校正各氨基酸峰延迟时间; 点击[OK][ON]。

3.7 调整基线[Procss][Manipulate]... (Manipulation operation) ... [OK] [Yes]。

3.8 执行校正[Procss] [Calibrate (1 point)] [NO]。

3.9 保存新方法[File][Save Method as...] (Enter the file name *.MET) [Save]; [File] [End]。

3.10 填加聚凝胺和样品

3.11 打开反应仓, 加入玻璃纤维膜, 点加 15 μ l 聚凝胺并吹干[Sequence][Sample Drying][Start], 或选择 PVDF 膜模式。

3.12 [Close]重新组装反应仓。

3.13 [Sequence Analysis Login...]

Reactor to be registered	Check Reactor!
Number of Cycles	[5]
Sequence Schedule File	Double-click on "Pretreat" in the [Sequence Schedule]box
Sample Amount (pmol)	[1] (Enter some digit)
Data Processing	Select[NO]
Create on registration	No check

[OK][Yes]

3.14 这一过程要 2.5 小时。

3.15 打开反应仓, 在玻璃纤维膜上, 点加 100pmol 样品并吹干[Sequence][Sample Drying][Start]。

3.16 [Close]重新组装反应仓。

3.17 [Sequence Analysis Login...]

Reactor to be registered	Check Reactor!
Number of Cycles	[16]
Sequence Schedule File	Double-click on "Standard GFD" in the [Sequence Schedule]box
Sample Name	
Sample Amount (pmol)	[50~100] (Enter some digit)
Sample ID	
Operator Name	
Data File	*.DATA
Method File	*.LCM
Data Processing	Select[Yes]
Data Processing File	*.PSQ
Sample Schedule File	*.STB
Create on registration	check

[OK][Yes]

每个循环要 44 分钟。

3.18 关机

- 3.18.1 选择<Real Time Analysis>窗口中的[Inactive]。
- 3.18.2 在 LC-20AT 面板上将 remote 改为 locate。
- 3.18.3 退出系统。
- 3.18.4 关闭检测器和主机。
- 3.18.5 关闭电脑。

4 结果与判定

将仪器测得的氨基酸序列与供试品蛋白的理论序列进行比较，应与理论序列一致。

5 注意事项

- 5.1 对于特殊样品要进行样品的前处理。
- 5.2 该方法对 Cys 无法直接测定。
- 5.3 氨基酸序列由软件自动给出，除另有规定外，人工修改序列必须给出修改理由。

起草人：杨靖清 陶磊

复核人：饶春明 周勇

纯度及分子量测定法 (SDS-PAGE 电泳法)

1 原理

十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳法 (SDS-PAGE) 是一种变性的聚丙烯酰胺凝胶电泳方法。聚丙烯酰胺凝胶是由单体丙烯酰胺和甲叉双丙烯酰胺聚合而成的三维网状结构。大多数蛋白质都能与阴离子表面活性剂 SDS 按重量比结合成复合物，使蛋白质分子所带的负电荷远远超过天然蛋白质分子的净电荷，掩盖了不同蛋白质间的电荷差别；而且 SDS 与蛋白质结合后，还可引起构象改变，形成椭球形，使其在凝胶中的迁移率，不再受蛋白质原电荷和形状的影响，而取决于分子量的大小。

在纯度分析中，供试品中的主成分与杂质蛋白按照分子量大小而分离，可通过面积归一化法计算主条带的百分含量。在分子量测定中，在一定范围内蛋白质的迁移率和分子量的对数呈线性关系，通过将已知分子量的标准蛋白质的迁移率对分子量对数作图，获得标准曲线，将目标蛋白的电泳迁移率代入标准曲线即可求得分子量。

SDS-PAGE 有垂直板和圆盘电泳，常用的染色方法有考马斯亮蓝染色法和银染法。目前在重组蛋白类生物制品的纯度和分子量测定中最常采用的是 SDS-PAGE 垂直板电泳结合考马斯亮蓝染色法，在此仅对该法进行介绍。

2 材料和设备

2.1 试剂

2.1.1 水: 去离子水, 电阻率不低于 $18.2\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$ 。

2.1.2 分离胶缓冲液 (4 \times , A 液): 1.5mol/L 三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液 (称取三羟甲基氨基甲烷 18.15g, 加适量水溶解, 用盐酸调 pH 值至 8.8, 加水稀释至 100ml)。

2.1.3 30%丙烯酰胺溶液 (B 液): 称取丙烯酰胺 58.0g、*N,N'*-亚甲基双丙烯酰胺 2.0g, 加温水溶解并稀释至 200ml, 滤纸过滤 (避光保存)。

2.1.4 10%SDS 溶液 (C 液): 称取十二烷基硫酸钠 10g, 加水溶解并稀释至 100ml。

2.1.5 四甲基乙二胺溶液 (TEMED, D 液): 10% *N,N,N',N'*-四甲基乙二胺, 通常为市售。

2.1.6 10%过硫酸铵溶液 (E 液): 称取过硫酸铵 10g, 加水溶解并稀释至 100ml。建议临用前配制, 或分装于 -20°C 可贮存 2 周。

2.1.7 浓缩胶缓冲液 (4 \times , F 液): 0.5mol/L 三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液 (称取三羟甲基氨基甲烷 6.05g, 加适量水使溶解, 用盐酸调 pH 值至 6.8, 加水稀释至 100ml)。

2.1.8 电极缓冲液 (10 \times): 称取三羟甲基氨基甲烷 30g、甘氨酸 144g、十二烷基硫酸钠 10g, 加水溶解并稀释至约 800ml, 用盐酸调 pH 值至 8.1~8.8 之间, 加水稀释至 1000ml。

2.1.9 非还原型供试品缓冲液 (4 \times): 称取三羟甲基氨基甲烷 3.03g、溴酚蓝 20mg、十二烷基硫酸钠 8.0g, 量取甘油 40ml, 加水溶解并稀释至约 80ml, 用盐酸调节至 pH 6.8, 加水稀释至 100ml。

2.1.10 还原型供试品缓冲液 (4 \times): 称取三羟甲基氨基甲烷 3.03g、溴酚蓝 20mg、十二烷基硫酸钠 8.0g, 量取甘油 40ml, 加水溶解并稀释至约 80ml, 加入 β -巯基乙醇 20ml, 用盐酸调节至 pH 6.8, 加水稀释至 100ml (或称取三羟甲基氨基甲烷 3.03g、溴酚蓝 20mg、十二烷基硫酸钠 8.0g, 量取甘油 40ml, 加水溶解并稀释至 80ml, 用盐酸调节至 pH 6.8, 加水稀释至 100ml。在使用前, 加入 DTT 至 100mmol/L)。

2.1.11 分子量标准品: 选用适宜的蛋白分子量标准品, 分子量范围应将供试品的分子量包括在其中。

2.1.12 固定液: 称取三氯醋酸 5g, 加水 200ml 溶解后, 加甲醇 200ml, 再加水至 500ml。

2.1.13 考马斯亮蓝染色液: 称取考马斯亮蓝 R250 1g, 加入甲醇 200ml、冰醋酸 50ml、水 250ml, 混匀。

2.1.14 考马斯亮蓝脱色液: 取甲醇 400ml、冰醋酸 100ml 与水 500ml, 混匀。

2.1.15 保存液取冰醋酸 75ml, 加水至 1000ml, 摇匀。

2.2 设备 电泳仪、垂直板电泳槽和制胶模具 (或商品化预制胶)、凝胶成像设备及分析软件。

3 操作方法

3.1 凝胶制备

3.1.1 制备分离胶溶液 根据不同分子量的需要, 或照各品种项下的规定, 制备适宜浓度的分离胶溶液, 灌入模具内至一定高度, 加水封顶, 室温下聚合。

3.1.2 制备浓缩胶溶液 待分离胶溶液聚合后, 用滤纸吸去上面的水层, 再灌入浓缩胶溶液, 插入样品梳, 注意避免气泡出现。

不同浓度的浓缩胶和分离胶配方见表 1，也可经充分验证后，使用商品化的预制胶。

表 1 不同浓度的浓缩胶和分离胶配方

凝胶种类	分离胶溶液					浓缩胶溶液	
	7.5%	10%	12%	12.5%	15%	4.5%	
凝胶浓度	7.5%	10%	12%	12.5%	15%	4.5%	
水	4.6	4.0	3.3	3.1	2.3	2.9	
30%丙烯酰胺溶液	2.7	3.3	4.0	4.2	5.0	0.75	
分离胶/浓缩胶缓冲液	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	1.25	
试液/ ml	10%SDS 溶液	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.05
	10%过硫酸铵溶液	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.05
	TEMED 溶液	0.006	0.004	0.004	0.004	0.004	0.005
总体积	10	10	10	10	10	5	

注：根据不同品种需求，如需配制不同比例或不同体积的分离胶，可参考上表进行适当调整。

3.2 样品制备

3.2.1 纯度测定用样品制备 取至少 10 μ g 供试品与非还原型供试品缓冲液（4 \times ）按 3:1 的比例混匀，或照各品种项下的规定制备，除另有规定外，置水浴中 100 $^{\circ}$ C 加热 3~5 分钟；对照品/标准品溶液同法操作。

3.2.2 分子量测定用样品制备 取至少 1 μ g 供试品与还原型供试品缓冲液（4 \times ）按 3:1 的比例混匀，或照各品种项下的规定制备，除另有规定外，置水浴中 100 $^{\circ}$ C 加热 3~5 分钟；对照品/标准品溶液同法操作。

3.3 测定法

3.3.1 加样 待浓缩胶溶液聚合后小心拔出样品梳，向电泳槽中加入适量电泳缓冲液，在加样孔中加入供试品溶液与对照品/标准品溶液。

3.3.2 电泳 恒压电泳，初始电压为 80V，进入分离胶时调至 150~200V，当溴酚蓝迁移至适宜位置，停止电泳。或恒流电泳，以恒流 10mA 条件下开始电泳，至供试品溶液进入分离胶后将电流调至 20mA，直至电泳结束。

3.3.3 固定与染色 考马斯亮蓝法电泳完毕，取出凝胶，置固定液中 30 分钟，取出凝胶，置染色液中 1~2 小时，用脱色液脱色至凝胶背景透明后保存在保存液中。

3.4 扫描 凝胶完成显色处理完毕后，对其进行拍照或扫描，通常用商品化的带有数据分析软件的凝胶扫描系统进行拍照和分析。

4 计算

按下式计算相对迁移率（ R'_m ）：

$$R'_m = \frac{\text{蛋白迁移距离}}{\text{脱色后胶条长度}} \times \frac{\text{脱色前胶条长度}}{\text{溴酚蓝指示剂迁移长度}}$$

5 结果与判定

5.1 分子量测定

5.1.1 系统适用性试验要求：除另有规定外，应符合以下要求。

5.1.1.1 分子量标准品条带分布应与说明书提供谱图一致。

5.1.1.2 以分子量标准品的分子量对数值为纵坐标，相对迁移率 R'_m 为横坐标，进行线性回归，得到的标准曲线应 $R^2 \geq 0.95$ 。

5.1.2 结果计算：将目的蛋白的 R'_m 代入标准曲线，计算分子量，应符合批准的要求。

5.2 纯度分析

5.2.1 系统适用性试验要求：除另有规定外，应符合以下要求。

5.2.1.1 每次试验应随行适宜的蛋白分子量标准品，其分离情况应符合 5.2.1 的要求。

5.2.1.2 灵敏度要求：应配制灵敏度对照溶液随行分析以避免过度脱色等影响，在本方法推荐的上样量条件下，至少应保证相当于 1% 供试品含量的条带能显色。

5.2.2 结果计算：经凝胶成像仪扫描，按峰面积归一化法计算结果，应符合批准的要求。

6 注意事项

6.1 应根据加样孔容量调整上样体积，避免上样体积过大而溢出。

6.2 纯度测定时，为避免上样量大导致相邻泳道的蛋白条带挤压，应间隔上样。

6.3 分子量测定时，应尽量避免使用两侧的上样孔，防止条带跑歪而导致分子量结果偏离。

6.4 也可采用经等效验证的商品化预制胶或其他试剂（如电泳缓冲液、染色液等）。

起草人：于雷 李响

复核人：饶春明

重组细胞因子产品肽图检查法

1 原理

蛋白酶或化学物质作用于蛋白质的特异性位点，并将其裂解为多个肽段，随后采用适宜的分析方法将这些肽进行分离，所获得的色谱峰形成为其特有的指纹图谱，通过与相应的理化对照品形成的肽谱峰形相比较是否一致，从而鉴定蛋白质一级结构的完整性和准确性，同时考察产品工艺的稳定性。

2 材料和设备

2.1 材料 所用试剂均需分析纯。

2.1.1 1%碳酸氢铵溶液：称取碳酸氢铵（ NH_4HCO_3 ）1.0g，加水溶解使成100ml。分装于Eppendorf管中， -20°C 保存。

2.1.2 TPCK-TRYPSIN：Sigma公司，用1%碳酸氢铵溶液配制成1mg/ml。

2.1.3 终止液（50%冰醋酸）：量取10ml冰醋酸，加水稀释至20ml。分装于Eppendorf管中，室温保存。

2.1.4 流动相A相（0.1%三氟醋酸水溶液）：量取三氟醋酸1ml，加水稀释定容至1000ml，摇匀，即得。

2.1.5 流动相B相（0.1%三氟醋酸乙腈溶液）：量取三氟醋酸1ml，加乙腈稀释定容至1000ml，摇匀，即得。

2.2 设备 高效液相色谱系统，色谱柱（辛烷基硅烷键合硅胶或十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂）。

3 操作方法

3.1 采用适当的办法将供试品的蛋白质浓度调整为1mg/ml左右（如果有对照品，处理方法和检测方法同供试品，如供试品和对照品浓度不够，则应浓缩至相应的浓度）。

3.2 供试品用碳酸氢铵溶液充分透析（3小时左右）。

3.3 按1:50（W/W）的比例加入TPCK-TRYPSIN， 37°C 保温24小时。

3.4 按1:10加入50%醋酸溶液终止反应，10000转/分钟离心5分钟或用 $0.45\mu\text{m}$ 滤膜过滤，收集上清液为肽图测定样品。

3.5 采用RP-HPLC对肽图测定样品进行分析。

色谱柱为ZORBAX 300SB-C8或者相类似的柱型，柱温为 $30^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C}$ ，样品保存温度为 $4^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$ ；流动相A液为含0.1%三氟乙酸的水溶液，B液为含0.1%三氟乙酸的乙腈溶液，使用70分钟的连续梯度（A液从100%至30%，B液从0%至70%），上样量 $100\mu\text{l}$ ，流速1ml/min，检测波长214nm。

3.6 系统适用性试验：用洗脱液作为流动相；按洗脱梯度洗脱，流速为1.0ml/min；检测波长为280nm。未裂解样品连续进样4次，其峰面积测量值的相对标准偏差应不大于2%，在选定条件下，量出样品主成分峰的保留时间 t_R （以分钟计）和半峰高宽（ $W_{h/2}$ ），按 $n=5.54(t_R/W_{h/2})^2$ 计算色谱柱的理论板数，理论板数应达到规定的要求。

4 结果计算

对得到的供试品或对照品高效液相图谱结果进行比较分析，检定结果根据规程要求判定（与对照品一致或批间一致）。

5 结果判定

供试品的肽图应与对照品图形一致。

6 注意事项

- 6.1 应按照仪器说明书要求对仪器进行使用、维护和保养。
- 6.2 流动相必须用色谱级的试剂，使用前过滤除去其中的颗粒性杂质和其他物质（使用 $0.45\mu\text{m}$ 或更细的膜过滤），过滤后用超声波脱气，脱气后应恢复到室温后使用。
- 6.3 应按说明书正确使用和维护色谱柱，尽量避免降低柱效、缩短使用寿命甚至损坏色谱柱，并注意监测色谱柱的性能情况。

起草人：韩春梅 李永红

复核人：饶春明 周勇

重组细胞因子产品纯度测定法 （反相高效液相色谱法）

1 原理

在反相色谱法中的固定相是被共价结合到硅胶载体上的直链饱和烷烃，其链的长短不同，最长的是十八烷基（这也是使用最多的固定相）、流动相的极性比固定相的极性强。在反相键合相色谱中，极性大的组分先流出、极性小的组分后流出。一般说来，固定相上的烷基配合基或被分离分子中非极性部分的表面积越大，或者流动相表面张力及介电常数越大，则缔合作用越强，保留值越大。

对于生物高分子（例如生物工程产物）的反相色谱分离、特别是对多肽药物的分离纯化，需要尽可能高的分离效率，应尽可能地选择球形、全多孔，且孔径为 $25\mu\text{m}$ 以上的硅烷键合固定相。单层键合固定相利于传质但稳定性稍差，而多层板合固定相传质虽稍差但稳定性好。对分子量较小者，可选用 ODS 型配基，而分子量较大者以配基较短者为宜，但链短者稳定性比链长者稍逊。结合无机和有机基质优点的聚合物涂层型固定相有着更广泛耐用的 pH 值范围，这对生物大分子的分离是极其有利的因素。不过聚合物涂层型无论从制造还是从使用方面尚不如键合相成熟。

作为反相色谱流动相的有机溶剂主要是乙腈、异丙醇四氢呋喃等，乙腈由于黏度低，且和水组成的二元流动相对多肽和蛋白质的溶解度高，因此被广泛应用，在醇类溶剂中，由于甲醇对一些蛋白质的溶解度低，因而使应用受到了限制，乙醇、正丙醇、特别是异丙醇，和水组成的洗脱体系一般可以得到高的蛋白质回收率而被广泛采用。在选择有机溶剂的同时，要充分考虑到反相柱的类型和生物大分子的特性。

2 材料和设备

2.1 材料

2.1.1 乙腈（色谱纯）。

2.1.2 三氟醋酸（色谱纯）。

2.1.3 洗脱液 A（0.1%三氟醋酸水溶液）：于 1000ml 的量瓶中加入水 950ml、三氟醋酸 1ml，再加水至 1000ml，混匀后，用 0.45 μ m 水溶性膜过滤备用。

2.1.4 洗脱液 B（0.1%三氟醋酸乙腈溶液）：于 1000ml 的量瓶中加入乙腈 1000ml、三氟醋酸 1ml，混匀后，用 0.45 μ m 脂溶性膜过滤备用。

2.1.5 高效液相色谱柱：反相 C18 柱。

2.2 设备 HPLC 系统，包括 Waters 2690HPLC 系统或类似系统、2487 紫外检测器或 996 二极管阵列检测器或类似系统、Waters Empower 数据管理系统或类似系统。

3 操作方法

3.1 色谱条件 流速：1.0ml/min。上样量：100 μ l（原浓度）。柱温：35 $^{\circ}$ C。检测波长：214nm 和 280nm。样品池温度：4 $^{\circ}$ C。环境温度：20~25 $^{\circ}$ C。

洗脱梯度如表 1 所示。

表 1 洗脱梯度表

时间 (min)	A (%)	B (%)
0	95	5
60	30	70
65	0	100
68	95	5
80	95	5

3.2 系统适用性试验 用洗脱液作为流动相；按洗脱梯度洗脱，流速为 1.0ml/min；检测波长为 214nm。样品连续进样 4 次，其峰面积测量值的相对标准偏差应不大于 5%，在选定条件下，量出样品主成分峰的保留时间 t_R （以分钟计）和半峰高宽（ $W_{h/2}$ ），按 $n=5.54(t_R/W_{h/2})^2$ 计算色谱柱的理论板数，理论板数应达到质量标准的要求。

3.3 进样洗脱 分别用 A、B 液，1.0ml/min 流速平衡高压液相系统各 20 分钟至基线平稳。不进样进行梯度运行，并记录色谱图。取样品 100 μ l 上柱，按表 1 梯度，以 1.0ml/min 流速洗脱，同时在检测波长下记录色谱图及有关数据，记录数据时间为 110 分钟。

4 结果计算

用高压液相系统的色谱工作站对实验结果进行数据处理，用面积归一化法算出其纯度，并打印出色谱报告。

5 结果判定

应符合批准的质量标准，通常为按照面积归一化法计算，主峰面积应不低于总面积的95.0%。

6 注意事项

6.1 应按照仪器说明书要求对仪器进行使用、维护和保养。

6.2 流动相必须用色谱级的试剂，使用前过滤除去其中的颗粒性杂质和其他物质（使用 $0.45\mu\text{m}$ 或更细的膜过滤），过滤后用超声波脱气，脱气后应恢复到室温后使用。

6.3 应按说明书正确使用和维护色谱柱，尽量避免降低柱效、缩短使用寿命甚至损坏色谱柱，并注意监测色谱柱的性能情况。

6.4 每隔一段时间（一个月）将硬盘中的分析数据拷贝至光盘上保存。

起草人：韩春梅 李永红

复核人：饶春明 周勇

重组细胞因子产品蛋白质纯度测定法 （分子排阻高效液相色谱法）

1 原理

色谱柱多以亲水硅胶、凝胶或经过修饰的凝胶如葡聚糖凝胶（Sephadex）和琼脂糖凝胶（Sephrose）等为填充剂，它们表面分布着不同孔径尺寸的孔，注入的受检供试品溶液，由相应流动相带入色谱柱内，它们中的大分子物质最早被洗脱出来，表现为保留时间较短，小分子物质在色谱柱中滞留时间较长，相应的保留时间长。其余分子则按分子大小依次被洗脱，同时进入检测器检测，由积分仪或数据处理系统记录和处理色谱信号。

2 材料和试剂

2.1 材料 所用试剂均需分析纯。

2.1.1 超纯水：电阻率不低于 $18.2\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$ 。

2.1.2 流动相（ 0.1mol/L 磷酸盐- 0.1mol/L 氯化钠缓冲液， pH 7.0）：分别称取磷酸氢二钠（ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ）1.15g、磷酸二氢钾（ KH_2PO_4 ）0.20g、氯化钠（ NaCl ）5.844g，用超纯水溶解后调 pH 值至7.0，并用水定容至1000ml，用 $0.45\mu\text{m}$ 水溶性膜过滤后备用。4℃保存，有

效期 1 个月。

2.1.3 高效液相色谱柱：TSKGEL3000SWXL (7.5mm×30cm) 或类似色谱柱 (具体产品色谱柱型号有所差异)。

2.2 设备 HPLC 系统, 包括 Waters 2690HPLC 系统或类似系统、2487 紫外检测器或 996 二极管阵列检测器或类似系统、Waters Empower 数据管理系统或类似系统。

3 操作方法

采用分子排阻色谱法进行分析: 色谱柱为 TSKGEL3000SWXL (7.5mm×30cm); 环境温度为 20~25℃; 柱温为 20~25℃; 样品池温度为 4℃; 检测波长 280nm; 流速 0.6ml/min; 上样量 100μl (蛋白含量不低于 20μg) 注入液相色谱仪。记录色谱图及有关数据, 记录数据时间为 30 分钟。

4 结果计算

用高压液相系统的色谱工作站对实验结果进行数据处理, 以目的蛋白色谱峰计算的理论板数应不低于 1000。按面积归一化法测量各杂质峰的面积和色谱图上除溶剂峰以外的总色谱峰面积, 计算各杂质峰面积及其之和占总峰面积的百分率, 算出其纯度, 并打印出色谱报告。

5 结果判定

应符合批准的质量标准, 通常为按照面积归一化法计算, 主峰面积应不低于总面积的 95.0%。

6 注意事项

6.1 应按照仪器说明书要求对仪器进行使用、维护和保养。

6.2 流动相必须用色谱级的试剂, 使用前过滤除去其中的颗粒性杂质和其他物质 (使用 0.45μm 或更细的膜过滤), 过滤后用超声波脱气, 脱气后应恢复到室温后使用。

6.3 应按说明书正确使用和维护色谱柱, 尽量避免降低柱效、缩短使用寿命甚至损坏色谱柱, 并注意监测色谱柱的性能情况。

起草人: 韩春梅 李永红

复核人: 饶春明 周勇

百白破疫苗

简 述

百日咳 (Pertussis, whooping cough) 是由百日咳杆菌 (*Bordetella pertussis*) 引起的急性呼吸道传染病, 病程可持续数月, 易感人群多为 6 岁以下儿童, 1 岁以内婴幼儿发病率约为总发病率的 50%。患者常伴有其他呼吸道病原感染, 而使病情加重, 例如急性支气管炎、病毒性肺炎和婴幼儿呼吸道窘迫症等, 甚至是死亡。百日咳在发病初期传染力最强, 不易诊断, 需要通过预防接种增加人群对百日咳杆菌的抵抗力、减少易感人群来有效控制和消灭百日咳。早在 1974 年, 世界卫生组织扩大免疫规划已将其列入需要控制的传染病之一。

白喉 (Diphtheria) 是一种急性上呼吸道传染病, 由革兰阳性白喉棒状杆菌 (*Corynebacterium diphtheria*) 引起。人群对白喉普遍易感, 以儿童为多。在实施白喉疫苗计划免疫接种前, 白喉是引起儿童死亡的一个重要原因。目前许多发展中国家仍然有白喉流行。

破伤风 (Tetanus) 是由破伤风梭状芽孢杆菌 (*Clostridium tetani*) 感染引起的高致死性疾病。目前, 在大部分发展中国家破伤风仍然是一个主要的公共卫生问题。世界范围内每年死于破伤风的人数约为 100 万, 其中约 80% 为新生儿。

通过对人群的疫苗广泛接种可有效降低疾病的发病率和死亡率。百白破联合疫苗 (Diphtheria, Tetanus and Pertussis Combined Vaccine, Adsorbed, DTP, 简称百白破疫苗), 即由百日咳疫苗原液、白喉类毒素原液及破伤风类毒素原液加入氢氧化铝佐剂制成。为乳白色悬液, 放置后佐剂下沉, 摇动后即成均匀悬液, 含防腐剂。接种百白破疫苗后, 可使机体产生免疫应答, 用于预防百日咳、白喉、破伤风。接种对象为 3 个月~6 周岁儿童, 免疫程序为: 基础免疫共 3 针, 自 3 月龄开始至 12 月龄, 每针间隔 4~6 周, 每次注射 0.5ml; 加强免疫通常在基础免疫后 18~24 月龄内进行, 注射剂量为 0.5ml。

百白破疫苗由百日咳疫苗、白喉疫苗和破伤风疫苗混合而成。目前全世界使用的白喉和破伤风疫苗均为白喉毒素 (Diphtheria toxin, DT) 和破伤风毒素 (Tetanus toxin, TT) 经精制、甲醛脱毒后的类毒素疫苗。百日咳疫苗包括全细胞百日咳疫苗 (Whole cell pertussis vaccine, WPV) 和无细胞百日咳疫苗 (Acellular pertussis vaccine, APV) 两种。因此百白破疫苗分为全细胞百白破疫苗 (DTwP) 和无细胞百白破疫苗 (DTaP)。其中, 无细胞百白破疫苗, 根据百日咳工艺的不同, 又分为共纯化无细胞百白破疫苗和组分无细胞百白破疫苗。

全细胞百日咳疫苗是由百日咳杆菌灭活制备而成, 生产工艺相对粗放, 含有较多杂质成分, 副反应发生率较高, 个别还可能产生较严重的脑神经症状甚至死亡, 已逐渐被无细胞百日咳疫苗取代。

共纯化无细胞百日咳疫苗是经采用共纯化技术 (如超速离心) 自发酵产物中提取百日咳抗原而制成。该技术能控制有效抗原的百分比, 但不能精确定量, 且含有较多非保护性抗原成分, 不同批次之间各有效成分的批间差较大, 保护力存在批间波动性。组分无细胞百日咳疫苗, 采

用的是柱色谱分别纯化工艺,组分百日咳抗原包括 PT、FHA 和百日咳粘着素 (Pertactin, PRN) 三种成分,有效抗原成分明确且精确定量,质量稳定可控。因此,组分无细胞百日咳疫苗与共纯化无细胞百日咳疫苗相比,其主要优势是组分百日咳疫苗中抗原成分及含量确定,质量可控,批间差异小。

目前,全细胞百日咳疫苗因接种不良反应高,在国内儿童计划免疫中已被共纯化无细胞百日咳疫苗完全替代,亦有多家企业正在进行组分无细胞百日咳疫苗的研发和申报。除百日咳三联疫苗外,另外还有白喉破伤风二联疫苗、单价破伤风疫苗等品种,主要用于 6 岁以上儿童、青少年以及成人免疫接种。

以百日咳疫苗为基础的多联疫苗的研发也日益增多,对于联合疫苗的质量控制,其每一种疫苗的效力应单独检测并符合联合疫苗成品的质量标准,同时符合其他相关的质控要求。

百日咳疫苗检定应依据现行版《中华人民共和国药典》或其他国家药品标准进行测定,并应符合相关要求。

百日咳疫苗的检定内容按照生产阶段分为原液、半成品、成品。其中,原液检定:包括百日咳疫苗原液、白喉类毒素原液及破伤风类毒素原液检定。百日咳疫苗原液检定,又分为全细胞百日咳疫苗原液检定和无细胞百日咳疫苗原液检定。全细胞百日咳疫苗原液检定,主要包括浓度测定、染色镜检、血清学试验、效价测定、无菌检查和特异性毒性检查;无细胞百日咳疫苗原液检定,主要包括染色镜检、效价测定、无菌检查、不耐热毒素试验、特异性毒性检查、毒性逆转试验和热原试验。白喉类毒素原液检定,主要包括 pH 值、絮状单位 (Lf) 测定、纯度、无菌检查、特异性毒性检查、毒性逆转等。破伤风类毒素原液检定,主要包括 pH 值、絮状单位 (Lf) 测定、纯度、无菌检查、特异性毒性检查、毒性逆转等。半成品检定:主要包括无菌检查等。成品检定:按照检验类别,一般分为①鉴别试验:包括无细胞百日咳疫苗鉴别试验 (动物法、ELISA 法等)、白喉类毒素鉴别试验 (动物法、免疫电泳法、絮状反应等)、破伤风类毒素鉴别试验 (动物法、免疫电泳法、絮状反应等);②物理检查:主要包括外观、装量、渗透压摩尔浓度;③化学检查:主要包括 pH 值、氢氧化铝含量、硫柳汞含量、游离甲醛含量、戊二醛含量;④效价测定:包括无细胞百日咳疫苗效价测定、白喉疫苗效价测定、破伤风疫苗效价测定;⑤无菌检查;⑥特异性毒性检查:包括无细胞百日咳疫苗特异性毒性检查、白喉破伤风疫苗特异性毒性检查;⑦毒性逆转试验;⑧细菌内毒素检查等。白喉、破伤风疫苗检定用标准品主要包括白喉、破伤风絮状反应抗毒素国家标准品 (絮状单位测定用)、吸附白喉类毒素效力国家标准品和吸附破伤风类毒素效力国家标准品。百日咳疫苗检定用标准品主要包括百日咳毒性国家标准品和百日咳效力国家标准品。

无细胞百日咳疫苗鉴别试验 (酶联免疫法)

1 原理

酶联免疫吸附试验 (ELISA) 是以免疫学反应为基础,将抗原、抗体的特异性反应与酶对底物的高效催化作用相结合起来的一种敏感性很高的试验技术。抗原、抗体的反应在一种固相载体——聚苯乙烯微量滴定板的孔中进行,每加入一种试剂孵育后,可通过洗涤除去多余的游离反应物,从而保证试验结果的特异性与稳定性。由于固相上的酶量与标本中受检物质的量呈一定的比例。加入酶反应的底物后,底物被酶催化成为有色产物,产物的量与标本中受检物质的量直接相关,故可根据呈色的深浅进行定性或定量分析。比较常用的 ELISA 包括

双抗体夹心法及间接 ELISA 法。在本实验中就是运用双抗体夹心检测特异抗原的夹心 ELISA 方法。

2 材料和设备

2.1 材料

- 2.1.1 包被液 (pH 9.6 碳酸盐缓冲液)。
- 2.1.2 洗涤液 (pH 7.4 PBS-Tween 20)。
- 2.1.3 封闭液 (10%牛血清、pH 7.4 PBS)。
- 2.1.4 酶标抗体稀释液 (5%牛血清、pH 7.4 PBS)。
- 2.1.5 TMB 底物液。
- 2.1.6 终止液: 2mol/L 硫酸。
- 2.1.7 包被抗体: PT, FHA 抗体。
- 2.1.8 酶标记抗体: 辣根过氧化物酶标记的 PT 抗体、FHA 抗体。
- 2.1.9 阳性质控品: 纯化的 PT, FHA 抗原。
- 2.1.10 阴性质控品: 0.01mol/L, pH 7.4 PBS。

2.2 设备 酶标仪。

3 操作方法

3.1 包被 将包被抗体稀释: 抗 PT 抗体稀释至 5 μ g/ml; 抗 FHA 抗体稀释至 5 μ g/ml; 每孔 100 μ l 包被酶标板, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时后, 4 $^{\circ}$ C 过夜, 洗板 3 次, 拍干。

3.2 封闭 加封闭液 200 μ l, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时, 洗板 3 次, 拍干后备用。

3.3 供试品的解吸附处理 每 0.5ml 供试品中加入 1mg 柠檬酸钠, 置于 37 $^{\circ}$ C 孵箱中过夜解吸附。

3.4 加样 分别向已封闭的酶标板中加入上述样品、PT (或 FHA) 阳性质控品 (2 μ g/ml) 和阴性质控品, 每孔 100 μ l, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时, 洗板 6 次, 拍干。

3.5 酶标二抗 各孔加抗 PT 酶标抗体 100 μ l, 稀释度为 1:1000~2000 (抗 FHA 酶标抗体, 稀释度为 1:1000~2000), 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时, 洗板 6 次, 拍干。

3.6 显色 加入 TMB 底物溶液, 每孔 100 μ l, 37 $^{\circ}$ C 显色 10~15 分钟, 加 2mol/L 硫酸每孔 50 μ l 终止反应, 波长 450nm 测定 OD 值。

4 结果计算

临界值计算, 临界值 = 阴性对照平均 OD 值 \times 2.1 (阴性对照 OD 值低于 0.05 作 0.05 计算, 高于 0.05 按实际 OD 值计算)。

5 结果与判定

供试品 OD 值 \geq 临界值为阳性, 供试品 OD 值 $<$ 临界值为阴性。

起草人: 王丽婵

复核人: 马霄

戊二醛残留量测定法

1 原理

本法采用反相高效液相色谱法 (RP-HPLC) 进行测定。反相高效液相色谱法是由非极性固定相和极性流动相所组成的液相色谱体系, 它正好与由极性固定相和弱极性流动相所组成的液相色谱体系 (正相色谱) 相反。RP-HPLC 的典型的固定相是十八烷基硅烷键合硅胶, 典型的流动相是甲醇和乙腈。RP-HPLC 是当今液相色谱的最主要的分离模式, 几乎可用于所有能溶于极性或弱极性溶剂中的有机物的分离。反相高效液相色谱法适于分离非极性、极性或离子型化合物。

戊二醛可与 2,4-二硝基苯肼反应生成正戊醛二硝基苯肼, 用反相高效液相色谱法, 可以测定正戊醛二硝基苯肼含量。通过已知戊二醛标准品溶液的浓度对应相应的峰面积得到标准曲线, 测定供试品中戊二醛含量。

2 材料和设备

2.1 溶液和试剂

2.1.1 试剂 戊二醛, 乙腈, 2,4-二硝基苯肼, 高氯酸。

2.1.2 溶液

2.1.2.1 0.001%戊二醛标准品溶液 (0.0424g/L): 精密量取标准戊二醛溶液 1.0ml, 加水至 1000ml, 置于玻璃瓶中, 现用现配。

2.1.2.2 2,4-二硝基苯肼溶液: 称取 2,4-二硝基苯肼 2.4g, 加 30%高氯酸溶液, 溶解成 100ml。

2.1.2.3 流动相: 乙腈-纯水=70:30 (V/V)。

2.2 设备

2.2.1 高效液相色谱仪。

2.2.2 检测器: 紫外-可见分光检测器, 检测波长为 360nm。

2.2.3 反相色谱柱: 十八烷基硅烷键合硅胶填充剂色谱柱。

2.2.4 离心机、天平、量筒。

3 操作方法

3.1 色谱条件 流速为每分钟 1.2ml; 柱温为 40℃; 记录时间为 30 分钟。

3.2 测定法

3.2.1 戊二醛标准品制备: 分别精密量取 0.001%戊二醛标准品溶液 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0ml 于试管中, 加乙腈 1.0ml, 混匀, 随后加入 2,4-二硝基苯肼溶液 0.1ml, 立即于混合器上混匀, 用 0.45μm 滤膜滤过即为处理后的戊二醛标准品溶液。

3.2.2 供试品处理: 取供试品适量, 以每分钟 3000 转离心 10 分钟, 精密量取上清液 1ml, 其余步骤与戊二醛标准品溶液处理相同, 即为处理后的供试品溶液。

3.2.3 测定: 分别取处理后的戊二醛标准品溶液与供试品溶液各 10μl, 注入液相色谱仪, 记录色谱图。

4 结果计算

4.1 本法的结果计算采用标准曲线法，用标准样品配制成不同浓度的标准系列，在与待测组分相同的色谱条件下，等体积准确进样，测量各峰的峰面积，用峰面积对样品浓度绘制标准曲线，此标准曲线应是通过原点的直线。若标准曲线不通过原点，则说明存在系统误差。标准曲线的斜率即为绝对校正因子。

4.2 以戊二醛标准品溶液各个稀释度的戊二醛积分峰面积与戊二醛含量为参数，应用直线回归分析建立标准曲线方程，根据供试品溶液中戊二醛积分峰面积计算出待检样品中戊二醛含量。

$$\text{戊二醛含量 (g/L)} = \text{经标准曲线计算结果} \times \text{稀释倍数} \div 1000$$

5 结果与判定

将计算获得的供试品戊二醛残留量与经批准的产品质量标准进行比较，若符合产品质量标准中戊二醛残留量要求，则判定为合格。

6 注意事项

6.1 所有化学试剂要求色谱级纯度。

6.2 所有溶液均需 0.45 μm 滤膜滤过，以防止堵塞色谱柱。

6.3 标准曲线的回归相关系数应不低于 0.98。

6.4 系统适用性验证：色谱系统的适用性试验包括理论板数、分离度、灵敏度、拖尾因子和重复性等五个参数。其中分离度和理论板数是二个最重要、也更具有实用意义的参数。分离度是判断两物质在一个方法中分离的程度，虽然与柱效相关，但在衡量系统适用性时，首先强调的应该是分离度，只有当色谱图中仅有一个色谱峰或测定微量成分时，规定柱效才有其特殊重要性。重复性和拖尾因子，分别对重现性和色谱峰的峰形做出了要求。重现性保证了方法的可重复性，对柱效能提出了要求，柱子老化，拖尾因子则难以达到要求。

起草人：王丽婵

复核人：马霄

无细胞百日咳疫苗效价测定法（小鼠脑腔攻击法）

1 原理

动物实验（animal experiment）指在实验室内，为了获得有关生物学、医学等方面的新知识或解决具体问题而使用动物进行的科学研究。

百日咳疫苗效力实验要通过动物实验（包括动物疾病模型的开发等）来阐明解决。本试验采用小鼠脑腔攻击的方法，是为了验证百日咳疫苗应具有免疫力而进行的检测性试验。试验建立在脑腔攻击的动物模型基础上，通过对特定品系的健康小鼠进行腹腔免疫，使之产生免疫保护效力，再使用具有一定毒力的百日咳活菌对小鼠进行脑腔攻击，观察疫苗对免疫后小鼠的保护力，并通过与定值标准品结果的比较，经过统计学计算得出该疫苗的免疫效价。

2 材料和设备

2.1 材料 无菌离心管、无菌吸管、无菌攻毒注射器及针头、消毒液与纱布、冰块或冰盒，试验动物（体重 10~12g、NIH 品系的雌性或雌雄各半健康试验小鼠），供试品，百日咳疫苗效力标准品，百日咳疫苗攻击用菌种（菌株号：18323/58030），稀释液（0.9%灭菌氯化钠溶液）。

2.2 设备 无菌操作间、生物安全工作台、负压动物室。

3 操作方法

3.1 供试品稀释 用 0.9%灭菌氯化钠溶液溶液将待检样品（原液稀释至成品浓度）8 倍稀释，并以 5 倍系列稀释法稀释成 3 个稀释度（稀释度应在剂量-反应曲线的线性范围内）。

3.2 标准品稀释 按照说明将标准品起始浓度稀释至 1IU/ml，并以 5 倍系列稀释法稀释成 3 个稀释度（稀释度应在剂量-反应曲线的线性范围内）。

3.3 攻击菌稀释 将百日咳攻击菌用 0.9%灭菌氯化钠溶液稀释至起始浓度 270 万/ml，用于供试品与标准品组动物的毒力攻击；同时将其进行 10 倍系列稀释，共 5 个稀释度，用于毒力对照组动物的毒力攻击。稀释菌液应置于冰盒保存，自稀释到攻毒完成不得超过 2.5 小时。

3.4 免疫 动物随机分组，供试品和标准品每个稀释度各腹腔注射 20 只小鼠，每只注射 0.5ml。同时饲养对照组小鼠。

3.5 攻毒 免疫注射后 21 天，用 270 万/ml 的攻击菌液对免疫的动物进行脑腔攻击，每只 0.03ml；同时进行毒力对照攻击，每个攻击菌稀释度攻击 10 只小鼠。攻击后观察 14 天。攻击后 3 天内死亡的动物不作统计，在观察期的 14 天内任何动物出现麻痹或头部肿胀均按死亡计算。

4 试验成立的条件

4.1 标准品和供试品的 ED_{50} 应在最大和最小免疫剂量之间，且剂量反应曲线在平行性及直线性上无明显偏差。

4.2 应用 Reed-Muench 法计算 LD_{50} ，攻击菌的 LD_{50} 应在 100~1000 的范围。

5 结果计算

应用质反应平行线法，通过与标准品比较，计算供试品的效价。

6 结果与判定

每 1 次人用剂量应不低于 4.0IU，且 95%可信限的低限应不低于 2.0IU。如达不到上述要求时可进行复试，但所有有效试验的结果必须以几何均值（如有概率分析法时，应用加权几何平均）来计算，达到上述要求判为合格。

起草人：王丽婵

复核人：马霄

无细胞百日咳疫苗特异性毒性检查法

1 原理

百日咳毒素（PT）是百日咳杆菌分泌的一种毒素蛋白，脱毒后的百日咳毒素 PT 是百日咳

疫苗的主要抗原成分,因此检测百日咳毒素是否被完全脱毒是百日咳疫苗重要的安全性指标。百日咳疫苗的特异性毒性试验包括小鼠白细胞增多毒性试验和小鼠组胺致敏试验,均为检测疫苗中PT的残余毒性而设立。若疫苗中PT残余毒性大,将导致免疫疫苗后的小鼠白细胞增多,组胺致敏后的小鼠体温降低。本试验即以此为原理进行无细胞百日咳疫苗特异性毒性的检查。

2 材料和设备

2.1 材料 试验动物(14~16g健康NIH小鼠,雌性);红细胞溶血剂、血球稀释液、0.9%灭菌氯化钠溶液、二磷酸组胺、无菌注射器及注射针头、无菌离心管、移液器及灭菌移液器头、计量杯、采血针;百日咳疫苗毒性参考品、供试品。

2.2 设备 计量秤、白细胞计数仪、肛温测量仪、37℃孵箱。

3 操作方法

3.1 小鼠白细胞增多毒性试验(LPU试验)

3.1.1 将无细胞百日咳毒性参考品进行3倍倍比系列稀释,至少含有3个稀释度;供试品无需稀释。

3.1.2 用NIH品系、体重为14~16g的小鼠至少10只为一组。供试品用一组动物,毒性参考品的每一稀释度各用一组动物。

3.1.3 每只小鼠分别腹腔注射0.5ml。

3.1.4 注射后3天分别取小鼠末梢血进行白细胞计数。

3.2 小鼠组胺致敏毒性试验(HSU试验)

3.2.1 将无细胞百日咳毒性参考品进行3倍倍比系列稀释,至少含有3个稀释度;供试品无需稀释。

3.2.2 用NIH品系、体重为14~16g的小鼠至少10只为一组。供试品用一组动物,毒性参考品的每一稀释度各用一组动物。

3.2.3 每只小鼠分别腹腔注射二磷酸组胺2mg(或盐酸组胺4mg)。

3.2.4 注射30分钟后分别测定小鼠肛温并记录之。

4 结果计算

试验结果经统计学方法处理,通过与毒性参考品比较,计算供试品小鼠的白细胞增多毒性和组胺致敏毒性的活性单位。

5 结果与判定

5.1 注射供试品小鼠的白细胞增多毒性的活性应不高于0.5LPU/ml。

5.2 注射供试品小鼠的组胺致敏毒性的活性应不高于0.8HSU/ml,且无动物死亡。

起草人:王丽婵

复核人:马霄

无细胞百日咳疫苗毒性检查法

每批供试品置37℃、4周,然后按照“无细胞百日咳疫苗特异性毒性检查法”中3.2项进

行试验。

白喉疫苗鉴别试验（免疫电泳法）

1 原理

免疫电泳法是指利用凝胶电泳与双向免疫扩散两种技术结合的实验方法，在电场作用下标本中各组分因电泳迁移率不同而分成区带，然后沿电泳平行方向将凝胶挖一沟槽，将抗体加入沟槽内，使抗原与抗体相互扩散而形成沉淀线。根据沉淀线的数量、位置及形状，以分析标本中所含组分的性质。此法在微量的基础上具有分辨率高，灵敏度高，时间短的特性，是很理想的分离和鉴定蛋白质混合物的方法。常用于抗原、抗体定性及纯度的测定。

2 材料和设备

2.1 材料

2.1.1 打孔玻璃板。

2.1.2 白喉（破伤风）絮状反应抗毒素国家标准品：依据说明书用电泳缓冲液稀释至抗体浓度为 100（50）Lf/ml。

2.1.3 电泳缓冲液（硼酸盐缓冲液，pH 8.6）：准确称取四硼酸钠 6.35g、硼酸 2.07g、氯化钠 9g 加蒸馏水至 1000ml。置于玻璃瓶中，室温保存，有效期 6 个月。

2.1.4 PBS（pH 7.2）：准确称取氯化钠 8.85g、磷酸二氢钠（ H_2O ）0.23g、磷酸氢二钠（ $12H_2O$ ）1.70g，加适量蒸馏水溶解，调 pH 值至 7.2，加水至 1000ml。置于玻璃瓶中，4℃ 保存，有效期 6 个月。

2.1.5 解聚液：准确量取 20% 二乙醇胺 1.25ml、10% Tritonx-100 0.20ml，加 PBS（pH 7.2）8.55ml，混匀。或 10% 碳酸钠溶液：准确称取无水碳酸钠 10g，加蒸馏水至 100ml。置于玻璃瓶中，4℃ 保存，有效期 6 个月。

2.1.6 1% 琼脂糖：准确称取琼脂糖 1.0g，加 20% 电泳缓冲液至 100ml，煮沸融化。置于玻璃瓶中，室温保存，有效期 6 个月。

2.1.7 0.9% 灭菌氯化钠溶液。

2.1.8 脱色液：量取 95% 乙醇 200ml、冰醋酸 70ml，加蒸馏水至 1000ml。置于玻璃瓶中，室温保存，有效期 6 个月。

2.1.9 染色液：准确称取考马斯亮蓝 G250（或 R250）2.5g，95% 乙醇 200ml，冰醋酸 70ml，加蒸馏水至 1000ml，在 60~70℃ 水浴中加热，使溶解。使用滤纸过滤后置于密闭玻璃瓶中，室温保存，有效期 12 个月。

2.2 设备 水平对流电泳仪、低速离心机、凝胶成像仪。

3 操作方法

3.1 供试品的处理 取 0.5ml 样品离心去除上清，加二乙醇胺解聚液 0.1ml，充分混匀，室温放置至少 1 小时反应时间，间隔约 20 分钟震荡混匀一次，离心取上清液进行试验；或取一定体积待检样品，离心去除大部分上清液，留下约 1ml 上清液及全部沉淀，加入 10% 碳酸钠溶液，调 pH 9.0~10.0，放置过夜。使用前离心取上清液进行试验。

3.2 对流电泳 取 1% 琼脂糖溶解液，铺电泳板，琼脂糖厚度约 2~3mm。用直径为 2mm

的打孔器打两排孔，排间距约 6mm，孔间边距约 2~3mm。然后在一排孔中加入供试品，另一排孔中加入经稀释的白喉（破伤风）絮状反应抗毒素国家标准品，置于水平对流电泳仪上。待检样品放置在阴极，抗毒素放置在阳极。在 5V/cm 电压下进行电泳 0.5~1 小时。

3.3 脱杂蛋白 电泳完成后，将电泳凝胶板放置于盛 0.9% 灭菌氯化钠溶液的容器内，浸泡洗脱 2~3 天。

3.4 染色 取出电泳凝胶，置于染色液中，用摇床摇动染色 40~60 分钟。

3.5 脱色 取出染色后的凝胶，置于脱色液中，用摇床摇动洗脱，不断更换新鲜的脱色液，直至凝胶底色背景近于无色为止。

3.6 成像记录 取出电泳凝胶，置于凝胶成像仪进行原始图片的拍摄记录。

3.7 保存 可将脱色后的凝胶，晾干，制成干胶永久保存。

4 结果

脱色后观察沉淀线，供试品和抗毒素标准品间应可观察到经染色的沉淀线。

起草人：谭亚军

复核人：马霄

白喉疫苗效价测定法（小鼠 Vero 细胞法）

1 原理

本试验是为了验证白喉疫苗所具有的免疫力而进行的检测性试验。试验建立在小鼠动物模型基础上，通过对特定品系的健康小鼠进行免疫，使之产生免疫保护抗体。由于 Vero 细胞对白喉毒素敏感，将经免疫产生的白喉抗体在体外与一定量的白喉毒素中和后，可通过 Vero 细胞法测定抗体中和后残余的白喉毒素含量，由此计算疫苗免疫后动物体内产生的抗体含量。实验结果通过与定值标准品结果的比较，经过统计学计算得出该疫苗的免疫效价。

2 材料与设备

2.1 材料 试验动物（小鼠，品系：NIH。体重：10~14g。性别：同一性别）；0.9% 灭菌氯化钠溶液、细胞培养液 MEM 培养液（加青霉素 100IU/ml，链霉素 100μg/ml，胎牛血清 10%）、吸附白喉类毒素效力国家标准品、白喉抗毒素国家标准品、试验用白喉毒素、阳性小鼠对照血清、0.25% 胰蛋白酶、Vero 细胞，96 孔细胞培养板、细胞培养瓶、细胞计数板。

2.2 设备 CO₂ 培养箱、细胞试验室。

3 操作方法

3.1 供试品稀释 用 0.9% 灭菌氯化钠溶液将供试品以等倍系列稀释法稀释成 3~5 个稀释度（稀释度应在剂量-反应曲线的线性范围内）。

3.2 标准品稀释 依据说明书用 0.9% 灭菌氯化钠溶液将吸附白喉类毒素效力国家标准品稀释至工作浓度，再以等倍系列稀释法稀释成 3~5 个稀释度（稀释度应在剂量-反应曲线的线性范围内）。

3.3 免疫 每一稀释度供试品免疫小鼠 8 只，每只小鼠腹部皮下注射 0.5ml。

3.4 采血 免疫 5 周后, 每只小鼠采血, 分离血清。56℃ 30 分钟灭活, 放 -20℃ 保存, 临用前解冻。

3.5 Vero 细胞检测

3.5.1 试验毒素试验量测定 Vero 细胞测定白喉抗体试验时毒素试验量采用 Lcd/10000。在 96 孔培养板中用 MEM 培养液将毒素做 2 倍系列稀释, 每孔 50μl, 然后向各孔中加入 50μl 标准白喉抗毒素 (0.0001IU/50μl), 加盖在室温放置 1 小时后, 加入 50μl Vero 细胞悬液 (细胞浓度 2.5×10^5 细胞/ml), 加盖, 放 37℃ CO₂ 培养箱培养 6~7 天后, 观察结果, 使细胞死亡的最大毒素稀释度孔就是 Lcd/10000。

Lcd/10000 的毒素量约相当于 1×10^{-4} Lf 的毒素适用于本试验。

3.5.2 Vero 细胞悬液 Vero 细胞培养于细胞培养瓶中, 待细胞长成占瓶底 80%~100% 单层时, 弃去上层培养液, 加入 0.25% 胰酶, 放 37℃ 孵育 1~5 分钟, 弃去胰酶, 加入 10ml 培养液, 打匀细胞进行计数, 用培养液调整细胞浓度至 2.5×10^5 细胞/ml。

3.5.3 血清抗体测定 于 96 孔细胞培养板中测定。

3.5.3.1 每孔中加入 50μl 细胞培养液, 但 A11、A12 和 H11、H12 孔不加, 而 G11、G12 加 100μl 培养液。

3.5.3.2 取 8 份待检血清, 分别加入 A1 至 H1 孔, 各 50μl, 横向进行 2 倍系列稀释, 直至 A10 和 H10 孔。

3.5.3.3 用细胞培养液将标准白喉抗毒素稀释至 0.008IU/ml, 加入 A11、A12、B11 和 B12 孔, 各 50μl, 从 B11 和 B12 孔开始竖向进行 2 倍稀释至 D11 和 D12 孔。

各孔中所加标准抗毒素的单位数:

A11 和 A12	0.0004IU
B11 和 B12	0.0002IU
C11 和 C12	0.0001IU
D11 和 D12	0.00005IU

3.5.3.4 H11 和 H12 孔加入阳性小鼠对照血清 50ul。

3.5.3.5 除 G11 和 G12 孔外, 向其余各孔中加入稀释至 Lcd/10000 的试验用白喉毒素 50μl, 轻轻转动培养板, 混匀, 加盖后室温放置 1 小时。

3.5.3.6 室温放置 1 小时后, 每孔中加入 50μl 2.5×10^5 细胞/ml Vero 细胞悬液, 加盖后放 37℃ CO₂ 培养箱培养 6~7 天。

3.5.3.7 培养 6~7 天后取出培养板, 观察测定结果。

根据培养液颜色变化记录结果, 黄色为 (+), 红色为 (-), 颜色不明显者则可用显微镜观察, 如单层细胞完整无损则为 (+), 否则记录 (-)。最终结果以打分表示, 即变成黄色的最高稀释度孔的 2 的指数, 例如: 变黄的最后 1 孔是稀释 256 倍即 2^8 , 则结果记为 8。

4 计算结果

4.1 结果观察 根据培养液颜色变化记录结果, 黄色为 (+), 红色为 (-), 颜色不明显者则可用显微镜观察, 如单层细胞完整无损则为 (+), 否则记录 (-)。最终结果以打分表示, 即变成黄色的最高稀释度孔的 2 的指数, 例如: 变黄的最后 1 孔是稀释 256 倍即 2^8 , 则结果记为 8。

4.2 试验成立的条件

4.2.1 E11、E12、F11 和 F12 孔代表毒素量和 Vero 细胞敏感度, 应为 (-), 如果出现 (+),

则毒素量和细胞敏感度都很低，应重试。

4.2.2 细胞孔 G11、G12 和阳性对照孔 H11、H12 应为 (+)，如出现 (-)，应重试。

4.2.3 抗毒素标准品对照孔 A11、A12 和 B11、B12 孔应为 (+)，而 C11、C12 和 D11、D12 应为 (-)，否则应重试。

4.3 结果计算 采用剂量-反应平行线法，通过与国家标准品（参考品）比较，得出供试品白喉类毒素效力的国际单位数（IU/ml）。

4.4 合格标准 供试品的效价每个人用剂量应不低于 30IU。如供试品的 95%可信区间超出 50%~200%范围，则供试品 95%可信限的低限效价应大于每人用剂量 30IU。

起草人：谭亚军

复核人：马霄

白喉疫苗特异性毒性检查法

1 原理

本试验的主要目的是检查制品中是否存在具有生物活性的白喉毒素。由于豚鼠对白喉毒素比较敏感，因此选用豚鼠作为实验动物。制品中残余的白喉毒素含量较低，因此需要仔细观察豚鼠的反应情况，特别需要注意是否出现晚期麻痹症状，如果出现，应在试验完成后对动物进行尸检，观察肾上腺是否红肿、肺部是否出现病变，以确定制品中是否存在具有生物活性的白喉毒素。

2 材料和设备

2.1 材料 试验动物（250~350g 健康豚鼠 4 只，同一性别），0.9%氯化钠溶液，无菌注射器及注射针头、移液器及灭菌移液器头、无菌离心管。

2.2 设备 计量秤。

3 操作方法

3.1 样品准备：至少需要 2.5ml 样品。

3.2 注射前称豚鼠体重并记录，对动物进行标记。

3.3 供试品吸取：吸取前，先将供试品的安瓿瓶（西林瓶）轻轻摇匀，用注射器吸取样品，洗涤针头及注射器，如此重复三次，然后吸取供试品供注射。注意注射针头应装紧，不漏气。

3.4 供试品注射：用碘酒棉及医用酒精棉消毒豚鼠腹部注射部位的皮肤，待酒精干后，将注射针头插入皮下穿过腹中线，将供试品注射于豚鼠的腹部皮下，分两侧注射，每侧 1.25ml。

4 结果观察

4.1 在注射后 6 天内，每日应观察局部反应，观察注射部位有无红肿、浸润、坏死、化脓等情况，并作好记录。如有上述局部反应，必须记录其面积大小（以 mm^2 计），并继续注意观察有无结痂、脱毛、脱皮现象，如有也应记录其面积大小。

4.2 白喉类供试品于注射后 10、20、30 天分别称动物体重一次（破伤风类供试品于注射

后 7、14、21 天称体重), 如发现有体重下降情况, 应追查其原因(是否与饲养环境卫生等有影响, 豚鼠有无腹泻等疾病), 并应将该豚鼠隔离饲养。

4.3 破伤风类供试品在注射后第三个星期开始即注意观察麻痹现象, 检查时将豚鼠自笼内取出置一大盘内, 令其自由行走, 观察四肢是否灵活如常。

4.4 试验到期体重下降及试验期间死亡的豚鼠应进行解剖, 检查是否有白喉中毒的现象(白喉中毒症状为注射部皮肤充血或坏死, 局部淋巴肿大, 肺充血, 副肾充血肿大, 心肌内壁有时能看到出血斑点)。

5 结果与判定

5.1 观察期间动物健康, 体重增加, 无麻痹现象及注射后 5 天内无严重局部反应者, 判为合格。

5.2 如局部反应属于特异反应, 则判为不合格。如为非特异性反应, 但 4 只中有 2 只以上有化脓、坏死现象, 也判为不合格。如仅有 1 只豚鼠有此现象时, 则应重试。

5.3 如体重持续下降, 应重试; 重试仍呈现体重持续下降则判为不合格。

起草人: 谭亚军

复核人: 马霄

破伤风疫苗鉴别试验

参见“白喉疫苗鉴别试验”。

破伤风疫苗效价测定法

1 原理

破伤风疫苗效价测定的目的是检测待检疫苗能否诱导机体产生保护性免疫力, 经典方法是采用动物法, 即: 破伤风类毒素免疫动物, 间隔一定时间待产生抗破伤风抗体后, 采用一定量的破伤风毒素对实验动物进行致死性攻击, 根据经疫苗免疫后实验动物的存活数, 与定值标准品进行比较, 通过统计学方法计算疫苗的效价。

2 材料和设备

2.1 试验动物 小鼠(品系: NIH, 体重: 14~16g, 性别: 雌雄各半)、豚鼠(品系: Hartley, 体重: 250~350g, 性别: 雌雄各半)。

2.2 0.9%灭菌氯化钠溶液。

2.3 毒素稀释液(0.2%明胶-PBS 缓冲液, pH 7.0): 准确称取明胶 2g、磷酸二氢钾 0.7g、磷酸氢二钠(无水) 2.2g、氯化钠 6.8g, 加入蒸馏水至 1000ml, 121℃ 15 分钟灭菌。室温保存, 有效期 1 周。

2.4 吸附破伤风类毒素效力国家标准品。

2.5 试验用破伤风毒素: 依据破伤风毒素说明书用毒素稀释液将试验用破伤风毒素稀释至 ①100LD₅₀: 用于经免疫的小鼠攻毒, 攻毒剂量 0.5ml 每只免疫小鼠(50LD₅₀/只); ②2LD₅₀:

用于对照小鼠攻毒，攻毒剂量 0.5ml 每只对照小鼠（ $1LD_{50}$ /只）。（或用毒素稀释液将试验用破伤风毒素稀释至 $100LD_{50}$ 用于经免疫的豚鼠攻毒，攻毒剂量 1ml 每只免疫豚鼠（ $100LD_{50}$ /只）；③ $1LD_{50}$ ：用于对照豚鼠攻毒，攻毒剂量 1ml 每只对照豚鼠（ $1LD_{50}$ /只）。

3 操作方法

3.1 供试品稀释 用 0.9% 灭菌氯化钠溶液将供试品以等倍梯度系列稀释法稀释成 3~5 个稀释度（中间的稀释度必须在攻毒后能保护约半数动物；稀释度间应具有明确的剂量反应梯度）。

3.2 标准品稀释 依据标准品说明书用 0.9% 灭菌氯化钠溶液将吸附破伤风类毒素效力国家标准品稀释至工作浓度，再以等倍梯度系列稀释法稀释成 3~5 个稀释度（中间的稀释度必须在攻毒后能保护约半数动物；稀释度间应具有明确的剂量反应梯度）。

3.3 免疫 每一稀释度样品免疫小鼠 14 只（或豚鼠 10 只），每只小鼠腹部皮下注射 0.5ml（或每只豚鼠腹部皮下注射 1.0ml）。另外 10 只小鼠不注射作为对照（或另外 5 只豚鼠不注射作为对照）。

3.4 攻毒 免疫 4 周后，每只经免疫的小鼠攻击 $50LD_{50}$ 破伤风毒素（或经免疫的豚鼠攻击 $100LD_{50}$ 破伤风毒素）。对照组健康小鼠注射 $1LD_{50}$ 破伤风毒素（或对照组豚鼠注射 $1LD_{50}$ 破伤风毒素）。攻击后观察 5 日，每日记录动物死亡结果。

4 计算结果

4.1 试验成立的条件

4.1.1 标准品及供试品组的最低稀释度能保护半数以上动物。

4.1.2 标准品及供试品组的最高稀释度能保护半数以下动物。

4.1.3 标准品及供试品组的中间稀释度应能保护高剂量与低剂量之间的动物数。

4.1.4 对照组动物应部分死亡。

4.1.5 标准品和供试品的剂量-反应曲线在平行性及直线性上无统计学上的显著性差异（ $P>0.05$ ）。

4.2 结果计算 依据攻毒后第 5 天动物存活数，采用 Probit 剂量-反应平行线法，通过与国家标准品（参考品）比较，得出待检样品破伤风类毒素效力的国际单位数（IU/ml）。

4.3 合格标准

4.3.1 供试品与标准品的统计分析应具有可接受的直线性和平行性。

4.3.2 供试品的效价每个人用剂量应不低于 40IU。如供试品的 95% 可信区间超出 50%~200% 范围，则供试品 95% 可信限的低限效价应大于每人用剂量 40IU。

起草人：谭亚军

复核人：马霄

脑膜炎球菌疫苗

简 述

流行性脑脊髓膜炎（简称流脑）是由脑膜炎奈瑟氏菌（或称脑膜炎球菌）感染引起的一种高重症率和高致死率的疾病，具有发病急、进展快、传染性强、隐性感染率高和病死率高等特点，是人类主要急性呼吸道传染病之一。

脑膜炎奈瑟菌为革兰阴性菌，单个或成对排列，无芽孢，无动力，有荚膜和菌毛，无鞭毛。可由病人鼻咽部、血液或脑脊液中检出。该菌对营养要求较高，在含有血液、血清的培养基、5% CO₂ 环境下方能生长。依据其荚膜多糖的不同特征可分为 12 个血清群，分别为 A、B、C、H、I、K、L、X、Y、Z、29E、W135 群。A、B、C、Y 和 W135 群是主要的流行菌群。

接种脑膜炎球菌疫苗（简称流脑疫苗）是目前预防流行性脑脊髓膜炎的最有效措施。目前我国已经上市的流脑疫苗有 A 群脑膜炎球菌多糖疫苗、A 群 C 群脑膜炎球菌多糖疫苗、ACYW135 群脑膜炎球菌多糖疫苗和适用于 2 岁以下婴幼儿的 A 群 C 群脑膜炎球菌多糖结合疫苗。

疫苗的质量控制是为了保证生产出的疫苗产品安全、有效，因此疫苗的质量控制应该是贯穿在其整个的生产过程中。从菌毒种筛选、生产、中间产品及成品的质量控制都应依据现行版《中国药典》或其他国家药品标准进行，并应符合相关要求。流脑疫苗质量控制按照生产阶段分为原液、半成品、成品。其中，原液质量控制：包括固体总量、蛋白质含量、核酸含量、O-乙酰基含量、磷含量、唾液酸含量、多糖分子大小分布、苯酚残留量、无菌检查、细菌内毒素检查；半成品质量控制：主要包括无菌检查等；成品质量控制：按照检验类别，一般分为鉴别试验、物理检查和化学检定等：物理检查主要包括外观、装量差异、渗透压摩尔浓度；化学检定主要包括水分、多糖含量、多糖分子大小分布测定；无菌检查；异常毒性检查；热原检查；细菌内毒素检查等。对于流脑结合疫苗，除了上述原液和半成品项目，还应对生产过程中的多糖衍生物、载体蛋白等进行质量控制，结合物原液应进行鉴别试验（包括流脑多糖鉴别和载体蛋白鉴别）、多糖含量、蛋白质含量、多糖与蛋白质比值、游离多糖含量、游离蛋白含量、分子大小分布测定、碳二亚胺残留量、氰化物残留量、无菌检查等；成品检定按照检验类别一般分为鉴别试验（包括流脑多糖和载体蛋白）、物理检查和化学检定。物理检查主要包括外观、装量差异、渗透压摩尔浓度，化学检定主要包括水分、pH、多糖含量、游离多糖含量、效力试验、无菌检查、异常毒性检查、热原检查、细菌内毒素检查等。

鉴别试验（免疫双扩散法）

1 原理

抗原和特异性抗体在琼脂糖凝胶介质中，有一定的盐离子存在下，两者相向扩散。当抗原与抗体扩散相遇，在合适的比例时会形成明显的沉淀线，从而对流脑疫苗的特异性进

行检查。

2 材料和设备

2.1 材料 琼脂糖、脑膜炎奈瑟氏菌参考血清、破伤风抗毒素国家参考品、健康兔血清、移液器，试验用具〔水平台，扩散用玻璃板，打孔器（3mm），湿盒等〕。

2.2 设备 培养箱、微波炉、通风橱。

2.3 溶液配制

2.3.1 染色液 称取考马斯亮蓝 R250（或 G250）1g，加入乙醇 200ml，冰醋酸 50ml，水 250ml，混匀，制成 0.2%考马斯亮蓝溶液，必要时用滤纸过滤。于密闭容器中放置备用。

2.3.2 脱色液 量取乙醇 400ml，冰醋酸 100ml，水 500ml，混匀，于密闭容器中放置备用。

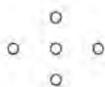
3 操作方法

3.1 制胶 称取一定量的琼脂糖，用 0.85%~0.9%氯化钠溶液溶解，制成终浓度 1%的琼脂糖溶液，微波炉加热至琼脂糖完全溶化。

3.2 制板 将溶化琼脂糖凝胶趁热（70℃以上）平铺一定厚度在水平玻璃板上，待凝固。

3.3 打孔 在凝固的琼脂糖凝胶玻璃板上，用打孔器打梅花孔，孔间距离 5~6mm。

样式举例：



3.4 供试品溶液的制备 用 0.85%~0.9%氯化钠溶液将供试品制成 200μg/ml 多糖溶液。

3.5 加样 中心孔（或周围孔）加入供试品溶液；周围孔（或中心孔）加入与多糖抗原相应的抗血清，加样量均为 10μl。同时用健康兔血清做阴性对照，然后置于湿盒中。

3.6 扩散 将湿盒于 37℃培养箱扩散 12~24 小时。

3.7 浸泡 将凝胶从玻璃板上轻轻取下，置于 0.85%~0.9%氯化钠溶液浸泡 2~3 天，每天更换 0.85%~0.9%氯化钠溶液。

3.8 染色 将浸泡后的凝胶用染色液染色 10~20 分钟。

3.9 脱色 取出凝胶置于脱色液中脱色，直至凝胶背景透明、沉淀线清晰为止。

3.10 制片保存 将完成脱色的凝胶固定在玻璃板上自然晾干，保存。

4 结果与判定

供试品周围孔与中心孔之间产生清晰的沉淀线，阴性对照无沉淀线产生，即流脑疫苗只与相应抗血清之间产生沉淀线，而不与其他抗血清之间产生沉淀线者，判为合格。

5 注意事项

5.1 配液及染色脱色应在通风橱中进行。

5.2 试验完成后废液需按规定回收废弃。

起草人：王春娥 李亚南
复核人：叶强

A 群脑膜炎球菌多糖含量测定法（磷含量测定法）

1 原理

A 群脑膜炎球菌多糖中的有机磷在高温、强酸的作用下，可以转换为无机磷，无机磷中的磷酸根在酸性溶液中与钼酸铵反应生成磷钼酸铵，磷钼酸铵遇还原剂生成三氧化钼和五氧化钼的蓝色混合物质，该物质在 820nm 处具有吸收峰，用比色法测定供试品中的磷含量，根据 A 群流脑多糖分子中与磷的相关系数计算流脑多糖含量。

2 材料和设备

2.1 材料 高氯酸、浓硫酸、30%过氧化氢，移液器、试剂瓶、刻度试管、试管架。

2.2 设备 涡漩振荡器、烤箱（可达 300℃）、紫外-可见分光光度计。

2.3 溶液配制

2.3.1 0.04mol/L 钼酸铵 称取钼酸铵 5g 于试剂瓶中，加入 100ml 蒸馏水将钼酸铵充分溶解。

2.3.2 还原剂 称取亚硫酸氢钠 6g，亚硫酸钠 1.2g，1-氨基-2-萘酚磺酸 0.1g，加入 50ml 蒸馏水充分溶解，置棕色试剂瓶中保存，一周内使用。

2.3.3 磷标准液（20μg/ml） 精确称取已干燥至恒重的磷酸二氢钾 439.3mg，置 100ml 标定的量瓶中，用少量蒸馏水充分溶解后稀释至刻度混匀，为每 1ml 含 1mg 磷的贮备液。精确量取贮备液 2ml，置于 100ml 标定的量瓶中，加蒸馏水稀释至刻度混匀，得磷标准液，2~8℃ 储存 6 个月。

3 操作方法

3.1 供试品溶液的制备 将供试品每瓶用蒸馏水按规定复溶 5~10 瓶混合，制备每 1ml 磷含量 4~20μg 的供试品溶液。

3.2 供试品处理及测定 精确量取 1ml 供试品溶液于刻度试管中，加入消化剂（浓硫酸约 0.08ml，高氯酸约 0.06ml）150℃加热 1 小时，升温至 180℃炭化供试品（约 2 小时），然后 250℃消化供试品至无色澄清。消化后稍置片刻，趁热加 2ml 左右蒸馏水（如冷却后加水，需再加热）。待样品冷却至室温后每管加 0.4ml 0.04mol/L 钼酸铵，混匀后加 0.2ml 还原剂混匀，每管补加蒸馏水至 6ml，震荡混匀静置 15~20 分钟后，于 820nm 波长测定吸光度。

3.3 标准曲线 精确量取磷标准液（20μg/ml）0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0ml，分别置于刻度试管中，每管补加蒸馏水至 1.0ml，自“加入消化剂”起，同“3.2”法操作，测定各管的吸光度。

4 结果计算

以磷标准溶液的系列浓度对其吸光度作直线回归，然后将供试品溶液的吸光度代入直线回归方程，并据其计算出供试品相当标准液之磷浓度。根据以下关系进行 A 群流脑多糖含量计算：

$$\text{磷含量} (\mu\text{g}/\text{剂量}) = \text{磷含量} (\mu\text{g}/\text{ml}) \div \text{加样量} (\text{剂量})$$

$$\text{多糖含量} (\mu\text{g}/\text{剂量}) = \text{磷含量} (\mu\text{g}/\text{剂量}) \div 0.075$$

5 结果与判定

每剂量 A 群脑膜炎球菌多糖含量应符合规定。

6 注意事项

- 6.1 标准曲线相关系数 (r) 应不低于 0.99 或 R^2 不低于 0.98。
- 6.2 趁热加 2ml 蒸馏水时, 避免溶液溅出管。
- 6.3 试验操作应做好防护措施、戴防护面具。
- 6.4 试验完成后废液需按规定回收废弃。

起草人: 王春娥 李亚南

复核人: 叶强

A 群脑膜炎球菌多糖测定法 (改良陈氏法测定磷含量)

1 原理

A 群脑膜炎球菌多糖分子中的有机磷在高温强酸的作用下, 可以转换为无机磷, 无机磷中的磷酸根在酸性溶液中与钼酸铵反应生成磷钼酸铵, 磷钼酸铵遇抗坏血酸生成黄色混合物质, 该物质在 825nm 处具有吸收峰, 用比色法测定供试品中的磷含量, 根据 A 群流脑多糖分子中与磷的相关系数计算 A 群脑膜炎球菌多糖含量。

2 材料和设备

2.1 材料 无机化试剂 (浓硫酸:高氯酸=1:1)、钼酸铵、抗坏血酸, 移液器、5ml 小管。

2.2 设备 水浴箱、烤箱 (可达 300℃)、紫外-可见分光光度计。

2.3 溶液配制

2.3.1 显色剂 现用现配。将 A 液倒入 B 液。

A 液: 1.5mol/L H_2SO_4 1 体积

2.5% (W/V) 钼酸铵 1 体积

纯水 2 体积

B 液: 10% (W/V) 抗坏血酸 1 体积

2.3.2 磷标准工作液 (2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 取 1mg/ml 磷标准储备液 0.5ml, 置于 250ml 量瓶中, 加水稀释至刻度混匀, 得 2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 磷标准工作液, 2~8℃ 储存 6 个月。

3 操作方法

3.1 供试品处理 将供试品每瓶用蒸馏水按规定复溶 5~10 瓶混合, 取 1.0ml (含磷 0.4~2.0 μg) 供试品加入到洁净的玻璃试管中, 每管加入无机化试剂 0.15ml 置于烤箱中; 150℃ 加热 1 小时; 供试品 180℃ 消化至黄棕色透明液体 (约 2 小时); 然后加热至 250℃ 消化至无色透明

液体（约 30 分钟），烤箱温度降至室温后将供试品取出。

3.2 显色 按表 1 依次操作：

表 1 显色操作程序

管号	0	1	2	3	4	5	6	样品
磷标准工作液 (ml)	—	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.0
纯水 (ml)	1.95	1.85	1.75	1.55	1.35	1.15	0.95	0.95
无机化试剂 (μl)	50	50	50	50	50	50	50	50
显色剂 (ml)	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
样品磷含量 (μg/ml)	0	0.2	0.4	0.8	1.2	1.6	2.0	A

充分混匀，37℃水浴 2 小时。

3.3 于 825nm 波长测定各管的吸光度。

4 结果计算

以磷标准工作溶液的系列浓度对其吸收度作直线回归，然后将供试品的吸光度代入直线回归方程，求出供试品磷含量 (μg/ml)。根据以下关系进行 A 群流脑多糖含量计算：

$$\text{磷含量 (μg/剂量)} = \text{磷含量 (μg/ml)} \div \text{加样量 (剂量)}$$

$$\text{多糖含量 (μg/剂量)} = \text{磷含量 (μg/剂量)} \div 0.075$$

5 结果与判定

每剂量 A 群脑膜炎球菌多糖含量应符合规定。

6 注意事项

- 6.1 标准曲线相关系数 (r) 应不低于 0.99 或 R² 不低于 0.98。
- 6.2 显色剂应为透明橙黄色，若颜色发绿需重新配制。
- 6.3 试验操作时应做好防护措施。
- 6.4 试验完成后废液需按规定回收废弃。

起草人：王春娥 李亚南

复核人：叶强

C 群脑膜炎球菌多糖含量测定法（唾液酸测定法）

1 原理

C 群脑膜炎球菌多糖分子中的以结合状态存在的唾液酸在酸的条件下可以水解成游离状态的唾液酸，游离状态的唾液酸与间苯二酚反应生成蓝色化合物，这种经有机酸萃取出的蓝色物质在 585nm 处有吸收峰，用比色法测定唾液酸含量。根据 C 群流脑多糖分子中与唾液酸的相关系数，计算 C 群脑膜炎球菌多糖含量。

2 材料和设备

2.1 材料 硫酸铜、间苯二酚、浓盐酸、正丁醇、乙酸丁酯，移液器、玻璃试管。

2.2 设备 水浴箱（可调至 100℃）、涡漩振荡器、紫外-可见分光光度计。

2.3 溶液制备

2.3.1 显色剂 分别量取 0.1mol/L 硫酸铜溶液 0.5ml、4%间苯二酚溶液 5ml、浓盐酸 80ml 于 100ml 量瓶中，补水定容至 100ml，混匀。临用时现配。

2.3.2 有机相 精确量取正丁醇 15ml 于 100ml 量瓶中，用乙酸丁酯定容至 100ml。

2.3.3 唾液酸对照品工作液（80μg/ml） 精确称取唾液酸 40mg，置于 100ml 标定的量瓶中，用少量蒸馏水充分溶解后定容至刻度，混匀，为每 1ml 含 400μg 唾液酸的贮备液。4℃保存使用期为 2 周。精确量取贮备液 2ml，置于 10ml 标定的量瓶中，用蒸馏水定容至刻度混匀，得唾液酸对照品工作液（80μg/ml）。临用时配制。

3 操作方法

3.1 供试品溶液的制备 将供试品每瓶用蒸馏水按规定复溶，5~10 瓶混合，去除供试品赋形剂后恢复相应体积，制备含唾液酸约 80μg/ml 的供试品溶液。

3.2 按表 2 依次加入下列试剂：

表 2 操作程序

序号	唾液酸标准液						样品管
对照品工作液 (ml)	0	0.1	0.2	0.4	0.8	1.6	-
样品 (ml)	-	-	-	-	-	-	1.0
纯水 (ml)	2.0	1.9	1.8	1.6	1.2	0.4	1.0
显色剂 (ml)	2.0						2.0
	摇匀，沸水浴中 15 分钟，冰浴冷却 5~10 分钟						
有机相 (ml)	4.0						4.0

3.3 将每管置于混匀器上 30 秒充分摇匀，室温静置 10 分钟后，以纯水对照为 0 管，每管取上层液，于 585nm 测定吸光度。

4 结果计算

以唾液酸对照品工作液的浓度对其相应的吸光度作直线回归，得直线回归方程。将供试品的 OD 值代入直线回归方程，求出供试品中唾液酸含量（μg），根据以下关系进行 C 群脑膜炎球菌多糖含量计算。

$$\text{唾液酸含量 (}\mu\text{g/剂量)} = \text{唾液酸含量 (}\mu\text{g)} \div \text{样品量 (剂量)}$$

$$\text{多糖含量 (}\mu\text{g/剂量)} = \text{唾液酸含量 (}\mu\text{g/剂量)} \div 0.75$$

5 结果与判定

每剂量 C 群脑膜炎球菌多糖含量应符合规定。

6 注意事项

- 6.1 相关系数 r 值应不低于 0.99 或 R^2 不低于 0.98。
- 6.2 比色时需小心取上层溶液，一次性取够所需量。
- 6.3 该试验操作应在通风橱里进行。
- 6.4 显色杯清洗后自然干燥后使用。
- 6.5 操作人员做好防护措施。
- 6.6 试验完成后废液需按规定回收废弃。

起草人：王春娥 李亚南

复核人：叶强

ACYW135 群脑膜炎球菌多糖疫苗多糖含量测定法（火箭免疫电泳法）

1 原理

火箭免疫电泳是通过使用一定强度的电流迫使抗原在含有抗体的凝胶中定向扩散。抗原扩散的浓度与抗体比例合适时发生抗原与抗体反应，形成火箭似的沉淀峰，且在恒定的抗体浓度下，峰的高度与抗原浓度成正比，从而进行抗原浓度的定量测定。

2 材料和仪器

2.1 材料 琼脂糖，0.05mol/L 巴比妥缓冲液（pH 6.8），20 μ g/ml A、C、Y、W135 群脑膜炎球菌多糖参考品，A、C、Y、W135 群脑膜炎球菌抗血清。

2.2 设备 水平台、扩散用玻璃板（约 5.5cm \times 12.5cm）、打孔器（3mm）、湿盒等、电泳仪、微波炉。

2.3 溶液制备

2.3.1 染色液 称取考马斯亮蓝 R250（或 G250）1g，加入乙醇 450ml，冰醋酸 100ml，水 450ml，混匀，制成 0.1%考马斯亮蓝溶液。必要时用滤纸过滤，于密闭容器中放置备用。

2.3.2 脱色液 量取乙醇 400ml，冰醋酸 100ml，水 500ml，混匀，于密闭容器中放置备用。

3 操作方法

3.1 制胶 称取 1.0g 琼脂糖，加至 100ml 0.05mol/L 巴比妥缓冲液中，加热完全溶解。

3.2 制板 待冷却至 50~56 $^{\circ}$ C 时，分别加入适量 A、C、Y、W135 群脑膜炎球菌抗血清，混匀后迅速倾倒入于水平放置的玻璃板上。

3.3 打孔 待琼脂糖凝固后打孔，孔径 3mm，孔间距离 4~5mm。

3.4 供试品制备 取每支供试品用 0.5ml 注射用水复溶后做 20 倍稀释，待用。

3.5 加样 各孔中分别加入 1、2、4、6、8、10、12 μ g/ml 的相应标准多糖和供试品溶液 10 μ l。

3.6 电泳 60V，2 小时。

3.7 染色、脱色 电泳结束后，取出琼脂糖凝胶放入 0.85%~0.9%氯化钠溶液内浸泡适宜时间后，用染色液染色至火箭峰出现，用脱色液脱色至背景清晰。

3.8 制片保存 将脱色好的凝胶固定在玻璃板上自然晾干，保存。

3.8 测量 准确测量火箭峰高。

4 结果计算

将各群脑膜炎球菌多糖参考品含量及对应的峰高作直线回归分析, 分别将供试品溶液电泳峰高度的值代入直线回归方程中, 求出各群脑膜炎球菌多糖含量。

5 结果与判定

每1次人用剂量ACYW135群脑膜炎球菌多糖疫苗含A群、C群、Y群、W135群多糖应分别为35~65 μg 。

6 注意事项

- 6.1 电泳应在冷却水循环作用下进行, 以防止凝胶干裂。
- 6.2 加样时应避免样品滴在加样孔外。
- 6.3 实验操作做好个人防护。
- 6.4 试验完成后废液需按规定回收废弃。

起草人: 王春娥 李亚南

复核人: 叶强

效力检查法

1 原理

本法系用A群C群脑膜炎球菌多糖结合疫苗免疫小鼠, 在规定时间内小鼠产生A群、C群脑膜炎球菌多糖抗体, 采用酶联免疫法分别测定免疫小鼠血清中的A群、C群脑膜炎球菌荚膜多糖抗体, 将试验组小鼠血清的抗体水平与对照组进行比较, 计算免疫组的阳转率, 以判定疫苗的免疫效果。

2 材料和设备

2.1 材料 BALB/c 或 NIH 小鼠 (12~14g, 雌性), 50mmol 碳酸盐/碳酸氢盐缓冲液 (pH9.6), 含 0.05%吐温 20 (Tween 20) 的磷酸盐缓冲液 (PBST), 胎牛血清, 羊抗鼠 IgG, 酶底物 (TMB 或 OPD), 终止液 (1.5mol/L H_2SO_4), 0.85%~0.90%氯化钠溶液, 多糖抗原 [A 群、C 群多糖 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)], 牛血清白蛋白 BSA。

2.2 设备 酶标仪。

3 操作方法

3.1 12~14g NIH 或 BALB/c 小鼠, 随机分试验组和对照组, 每组至少 10 只。

3.2 每只小鼠于第 0 天、第 14 天腹股沟皮下注射 2 次, 每次每只注射分别含各组分多糖 2.5 μg 的疫苗; 对照组注射 0.85%~0.9%氯化钠溶液。注射剂量 0.5ml/只小鼠。于第 1 针后第 21~28 天采血, 分离血清-20 $^{\circ}\text{C}$ 以下保存备用。

3.3 分别用 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的相应多糖抗原包被 96 孔板, 100 $\mu\text{g}/\text{孔}$, 2~8 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。

3.4 用 PBST 洗板 3 次后每孔加入 150 μ l 封闭液, 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 小时。

3.5 用 PBST 洗板 3 次, 用 PBST-1%胎牛血清按照操作规程要求将各组供试血清进行稀释, 将稀释好的血清加入酶标板, 100 μ l/孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。

3.6 用 PBST 洗板 3 次, 加入溶于 PBST-1%胎牛血清的羊抗鼠 IgG, 每孔 100 μ l, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟。

3.7 用 PBST 洗板 3 次, 加底物液 (TMB 或 OPD), 每孔 100 μ l, 室温避光 20 分钟。

3.8 每孔加入终止液 50 μ l 终止反应, 于酶标仪上用 450nm、以 630nm 做参比测定吸光度值。

4 结果计算

各孔扣除空白对照吸光度值后, 计算临界值。

$$\text{临界值} = 2.1 \times \text{阴性对照组平均吸光度值}$$

5 结果与判定

血清抗体 OD 值 \geq 临界值, 即为抗体阳性。疫苗组抗体阳转率应不低于 80%。

6 注意事项

6.1 免疫小鼠时避免供试品溶液泄露; 并注意避免小鼠行动过程中磨损注射部位。

6.2 阴性对照 OD 值应小于 0.200。

6.3 试验人员免疫小鼠时应避免被动物抓伤、避免自伤。

6.4 血清应充分稀释。

6.5 试验完成后酶标板应按规定废弃。

起草人: 王春娥 李亚南

复核人: 叶强

游离多糖含量测定法

1 原理

脑膜炎球菌多糖与载体蛋白结合形成多糖与蛋白相结合的高分子结合物, 而冷酚可以使载体蛋白变性形成沉淀。根据这一原理用冷酚将多糖与蛋白结合物进行沉淀, 未与蛋白结合的多糖则游离在上清液中, 对上清液中的多糖进行测定。

2 材料和设备

2.1 材料 重蒸酚、饱和醋酸钠、无机化试剂 (浓硫酸: 高氯酸 = 1: 1), 钼酸铵、抗坏血酸、间苯二酚、硫酸铜、浓盐酸、正丁醇、乙酸丁酯, A 群、C 群参考多糖, 3K 截留超滤管 (PALL, MicrosepTM 3k MWCO, 或可替代的类似产品), 移液器, 5ml 玻璃小管、中管。

2.2 设备 离心机、涡旋振荡器、水浴箱 (可达 100 $^{\circ}$ C)、烤箱 (可达 300 $^{\circ}$ C)、紫外-可见分光光度计。

2.3 溶液配制

2.3.1 冷酚溶液 取重蒸酚 196g, 在 42℃ 水浴至溶液。取饱和醋酸钠溶液 7.84ml, 溶于蒸馏水至 78.4ml, 调 pH 至 7.0 ± 0.05 , 即为 1/10 饱和醋酸钠溶液。将酚溶液加至配制好的 1/10 饱和醋酸钠溶液中, 即为冷酚溶液。于 2~8℃ 避光保存 6 个月。

2.3.2 测磷用显色剂: 现用现配。将 A 液倒入 B 液。

A 液: 1.5mol/L H_2SO_4 1 体积
2.5% (W/V) 钼酸铵 1 体积
纯水 2 体积

B 液: 10% (W/V) 抗坏血酸 1 体积

2.3.3 磷标准工作液 (2.0 μ g/ml) 取 1mg/ml 磷标准贮备液 0.5ml, 置于 250ml 量瓶中, 加水稀释至刻度混匀, 得 2.0 μ g/ml 磷标准工作液, 2~8℃ 储存 6 个月。

2.3.4 测唾液酸用显色剂 0.1mol/L 硫酸铜溶液 0.5ml、4% 间苯二酚溶液 5ml、浓盐酸 80ml, 补水至 100ml, 混匀。临用时现配。

2.3.5 有机相 精确量取正丁醇 15ml 于 100ml 量瓶中, 用乙酸丁酯定容至 100ml。

2.3.6 唾液酸对照品工作液 (80 μ g/ml) 精确称取唾液酸 40mg, 置于 100ml 标定的量瓶中, 用少量蒸馏水充分溶解后定容至刻度, 混匀, 为每 1ml 含 400 μ g 唾液酸的贮备液。4℃ 保存, 使用期为 2 周。精确量取贮备液 2ml, 置于 10ml 标定的量瓶中, 用蒸馏水定容至刻度混匀, 得唾液酸对照品工作液 (80 μ g/ml), 临用时配制。

3 操作方法

3.1 供试品预处理 (可选) 含有乳糖保护剂的冻干供试品用纯水复溶后, 采用 3K 截留超滤管离心 (4260g, 离心 20~40 分钟, 用适量纯水重悬后重复离心 3 次) 去除乳糖。最后恢复至适宜体积, 使多糖含量约为 20~30 μ g/ml 为宜。

3.2 冷酚抽提



3.3 A 群游离多糖含量测定

	参考多糖对照		供试品	
	P1 (未处理样品)	P1' (上清)	P2 (未处理样品)	P2' (上清)
取样量 (ml)	V	V	V	V

注: V 为取样体积, 操作步骤见“A 群脑膜炎球菌多糖测定法(改良陈氏法测定磷含量)”。

3.4 C 群游离多糖含量测定

	参考多糖对照		供试品	
	P1 (未处理样品)	P1' (上清)	P2 (未处理样品)	P2' (上清)
取样量 (ml)	V	V	V	V

注: V 为取样体积, 操作步骤见“C 群脑膜炎球菌多糖含量测定法(唾液酸测定法)”。

4 结果计算

4.1 A 群脑膜炎球菌游离多糖 用磷标准工作液的浓度对其相应的吸光度(OD)值作直线回归, 得直线回归方程[相关系数(r)应不低于 0.99 或 R^2 不低于 0.98]。将供试品的 OD 值代入直线回归方程, 求出供试品磷含量($\mu\text{g/ml}$)。根据以下公式计算游离多糖含量。

参考多糖回收率(%) = $P1'$ 磷含量 / $P1$ 磷含量 $\times 100$ (应介于 80%~120%之间)

供试品游离多糖含量(%) = $P2'$ 磷含量 / $P2$ 磷含量 $\times 100$

校正供试品游离多糖含量(%) = 供试品游离多糖含量(%) \div 参考多糖回收率(%) $\times 100$

4.2 C 群脑膜炎球菌游离多糖 用唾液酸对照品工作液的浓度对其相应的吸光度(OD)值作直线回归, 得直线回归方程。将供试品的 OD 值代入直线回归方程, 求出供试品唾液酸含量(μg)。根据以下公式计算游离多糖含量。

参考多糖回收率(%) = $P1'$ 唾液酸含量 / $P1$ 唾液酸含量 $\times 100$ (应介于 80%~120%之间)

供试品游离多糖含量(%) = $P2'$ 唾液酸含量 / $P2$ 唾液酸含量 $\times 100$

校正供试品游离多糖含量(%) = 供试品游离多糖含量(%) \div 参考多糖回收率(%) $\times 100$

5 结果与判定

A 群游离多糖含量应不高于 25%, C 群游离多糖应不高于 30%。

6 注意事项

- 6.1 试验操作应做平行管。
- 6.2 应一次性取够试验样品量, 避免重复取样。
- 6.3 测定 A 群游离多糖所用显色剂应为透明橙黄色, 若颜色发绿需重新配制。
- 6.4 比色时需小心取上层溶液, 一次性取够所需量。
- 6.5 该试验操作应在通风橱里进行。
- 6.6 显色杯清洗后自然干燥后使用。
- 6.7 操作人员试验操作应戴防护面具, 做好防护措施。

6.8 试验完成后废液需按规定回收废弃。

起草人: 王春娥 李亚南

复核人: 叶强

多糖分子大小分布测定法

1 原理

多糖分子量因大小不同, 可以通过凝胶色谱法进行分离, 分别先后流出色谱柱床。分子量大的物质由于在柱床固定相中的阻滞作用小, 在凝胶颗粒间孔隙随流动相流动, 流程短, 先析出柱床; 而分子量小的物质则在柱床固定相中的阻滞作用大, 可渗入凝胶颗粒中, 流程长, 比分子量大的物质迟流出柱床。根据流出柱床的顺序, 计算分子大小。

2 材料和设备

2.1 材料

2.1.1 琼脂糖 4B 凝胶或琼脂糖 CL-4B (GE)。

2.1.2 流动相: 称取氯化钠 11.7g、叠氮钠 0.1g, 加水使溶解成 1000ml, 混匀, 用 0.1mol/L 氢氧化钠溶液调 pH 值至 7.0。

2.1.3 蓝色葡聚糖 2000 溶液 (2mg/ml)。

2.1.4 维生素 B₁₂ 溶液 (1mg/ml)。

2.1.5 色谱柱 (1.5 × 90cm 或 GE XK 16/100 色谱柱, 或类似产品)。

2.1.6 洗脱液贮瓶及收集管。

2.1.7 3K 截留超滤管 (PALL, Microsep™ 3K, 或可替代的类似产品)。

2.2 设备 色谱系统、紫外分光光度计。

3 操作方法

3.1 第一法 (分管测定法)

3.1.1 色谱柱的制备 按照说明书底部装配好清洁色谱柱。取琼脂糖 4B 凝胶或琼脂糖 CL-4B 约 200ml, 加流动相 400ml, 充分搅拌并放置约 1 小时使其沉淀, 倾去上层悬浮颗粒的悬液。如此反复数次后, 加 200ml 流动相, 混匀, 抽去凝胶中的空气, 装于色谱柱中, 约 87~93cm 高。装配好色谱柱上部, 并与泵相连。用流动相洗脱, 流速为每小时 15~20ml, 以 2~3 倍柱床体积的流动相洗脱 (约 500ml), 使柱床平衡。

3.1.2 色谱柱的标定 取蓝色葡聚糖 2000 溶液 1ml, 加至已平衡的色谱柱中, 以流动相洗脱, 流速每小时 15~20ml, 用组分收集器收集洗脱液, 每管收集 3~5ml, 在紫外分光光度计上以 260nm 测定各管洗脱液的吸光度, 以吸光度为纵坐标, 洗脱液体积 (ml) 为横坐标分别作图, 波长 260nm 处的峰顶洗脱液体积为空流体积 V₀。

量取维生素 B₁₂ 溶液 1ml, 自“加至已平衡的色谱柱中”起, 同法操作, 370nm 波长处的峰顶洗脱液体积为柱床体积 V₁。

3.1.3 供试品制备及上样 用适量蒸馏水溶解适量供试品, 用 3K 截留超滤管离心, 4260g, 离心 20~40 分钟, 用适量纯水重悬后重复离心 3 次, 去除乳糖, 用流动相恢复体积 1.2~1.5ml。

用流动相清洗进样环 2~3 次, 用进样器取 1.2~1.5ml 供试品 (多糖抗原大于 1.0mg), 加于进样环。

3.1.4 洗脱 运行设定的程序, 以流动相洗脱至少 1.5 个柱床体积, 流速每小时 15~20ml (通常设定为 0.3ml/min)。

3.1.5 收集及测定

3.1.5.1 A 群脑膜炎球菌多糖疫苗分子大小测定: 用收集器收集洗脱液, 每管收集 3~5ml, 照“A 群脑膜炎球菌多糖测定法 (改良陈氏法测定磷含量)”测定每管洗脱液的磷含量, 以供试品每管洗脱液的磷含量为纵坐标, 洗脱液体积 (ml) 为横坐标作图, 主峰峰顶洗脱体积为 V_e 。

3.1.5.2 A 群 C 群脑膜炎球菌多糖疫苗分子大小测定: 用收集器收集洗脱液, 每管收集 4.5ml, 每管取 2ml 另置于中管中进行 C 群分子大小测定, 照“C 群脑膜炎球菌多糖含量测定法 (唾液酸测定法)”测定每管洗脱液的唾液酸含量。取 1.0ml 进行 A 群多糖分子大小测定, 照“A 群脑膜炎球菌多糖 (改良陈氏法测定磷含量)”测定每管洗脱液的磷含量。以供试品每管洗脱液的磷含量/唾液酸含量为纵坐标, 洗脱液体积 (ml) 为横坐标作图, 主峰峰顶洗脱体积为 V_e 。

3.1.5.3 ACYW135 群脑膜炎球菌多糖疫苗分子大小测定: 用收集器收集洗脱液, 每管收集 3~5ml, 照“ACYW135 群脑膜炎球菌多糖疫苗多糖含量测定法 (火箭免疫电泳法)”测定每管洗脱液中 A、C、Y、W135 群多糖峰高值, 分别以供试品每管洗脱液的多糖峰高值为纵坐标, 洗脱液体积 (ml) 为横坐标作图, 主峰峰顶洗脱体积为 V_e 。

3.2 第二法 (仪器法)

3.2.1 色谱柱的制备 同第一法。

3.2.2 色谱柱的标定 量取蓝色葡聚糖 2000 溶液 1ml, 与维生素 B_{12} 溶液 0.2ml, 混匀后加至已平衡的色谱柱中, 以流动相洗脱, 流速每小时 15~20ml, 检测波长 206nm, 记录色谱图。色谱图中, 第一峰为蓝色葡聚糖 2000 峰, 峰顶的洗脱液体积为空流体积即为 V_0 。第二峰为维生素 B_{12} 峰, 峰顶的洗脱液体积为柱床体积为 V_1 。

3.2.3 供试品制备及上样 同第一法。

3.2.4 洗脱 运行设定的程序, 以流动相洗脱至少 1.5 个柱床体积, 流速每小时 15~20ml (通常设定为 0.3ml/min), 检测波长 206nm, 记录色谱图, 即得供试品洗脱峰峰顶体积 V_e 。

4 结果计算

4.1 供试品在色谱柱中分配系数 (K_D) 的计算

$$K_D = (V_e - V_0) / (V_1 - V_0)$$

4.2 K_D 值 < 0.5 多糖抗原回收率计算 (分管测定法)

4.2.1 A 群脑膜炎球菌多糖疫苗

K_D 值 < 0.5 A 群多糖抗原回收率 (%) = [K_D 值小于 0.5 各管洗脱液中磷含量 (吸光度值) 之和] / [供试品所有管洗脱液的磷含量 (吸光度值) 之和] × 100

4.2.2 A 群 C 群脑膜炎球菌多糖疫苗

K_D 值 < 0.5 A 群多糖抗原回收率 (%) = [K_D 值小于 0.5 各管洗脱液中磷含量 (吸光度值) 之和] / [供试品所有管洗脱液的磷含量 (吸光度值) 之和] × 100

K_D 值 < 0.5 C 群多糖抗原回收率 (%) = [K_D 值小于 0.5 各管洗脱液中唾液酸含量 (A 值) 之和] / [供试品所有管洗脱液的唾液酸含量 (A 值) 之和] × 100

4.2.3 ACYW135 群脑膜炎球菌多糖疫苗

K_D 值 < 0.5 各群多糖抗原回收率 (%) = (K_D 值小于 0.5 每管洗脱液中各群多糖峰高值和 / (供试品所有管洗脱液的各群多糖峰高之和)) × 100

4.3 K_D 值 < 0.5 多糖抗原回收率计算 (仪器法)

K_D 值 < 0.5 多糖抗原回收率 (%) = (K_D 值小于 0.5 的色谱图面积) / (供试品色谱图总面积) × 100

5 结果与判定

5.1 A 群脑膜炎球菌多糖疫苗 K_D 值应不高于 0.40, K_D 值小于 0.5 的洗脱液多糖回收率应符合规定。

5.2 A 群 C 群脑膜炎球菌多糖疫苗 A 群、C 群多糖分子的 K_D 值均应不高于 0.40, K_D 值小于 0.5 的洗脱液多糖回收率应分别符合规定。

5.3 ACYW135 群脑膜炎球菌多糖疫苗 A 群、C 群、Y 群、W135 群多糖分子的 K_D 值均应不高于 0.40, K_D 值小于 0.5 的洗脱液多糖回收率应分别符合规定。

6 注意事项

6.1 过柱操作在 10~20℃ 进行。

6.2 操作时应注意避免色谱柱进气泡。

6.3 待检样品超滤后充分洗涤超滤膜。

6.4 如采用分管测定法, 试验开始前应确保收集器上摆放足够的收集管。

6.5 如采用分管测定法, A 群及 A 群 C 群脑膜炎球菌疫苗回收率计算时, 磷含量及唾液酸测定时可不必做标准曲线。

6.6 其他注意事项参见: “A 群脑膜炎球菌多糖测定法 (改良陈氏法测定磷含量)”、“C 群脑膜炎球菌多糖含量测定法 (唾液酸测定法)” 注意事项。

起草人: 王春娥 李亚南

复核人: 叶强

23 价肺炎球菌多糖疫苗

简 述

肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*), 是具有荚膜的革兰阳性球菌, 荚膜是其主要毒力因子, 其主要成分是荚膜多糖。根据荚膜多糖化学组成的不同, 目前肺炎链球菌已分离鉴别出 46 个血清群、90 多个血清型。23 价肺炎球菌多糖疫苗, 由 23 种常导致发病的血清型别的荚膜多

糖混合而成，每一血清型荚膜多糖的含量为 25 μg ，主要用于老年人尤其是老年住院病人，预防在疫苗中含有的肺炎球菌血清型引起的肺炎、脑膜炎、中耳炎和菌血症等疾病。23 价肺炎球菌多糖疫苗系采用 1、2、3、4、5、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、17F、18C、19A、19F、20、22F、23F 和 33F 型肺炎链球菌分别进行液体培养，经提取和纯化获得荚膜多糖抗原稀释合并制成。

23 价肺炎球菌多糖疫苗应依据现行版《中国药典》三部或其他国家药品标准进行检定，并应符合相关要求。

23 价肺炎球菌多糖疫苗制造与检定的质量标准主要包括生产用菌种、原液（精制多糖）、半成品和成品，要求均需按现行版《中国药典》三部或其他国家药品标准进行相应质量控制与检定。生产用菌种质量控制与检定应符合《中国药典》三部“生物制品生产检定用菌毒种管理规程”的有关规定，主要包括培养特性、染色镜检、生化反应、胆汁溶菌试验、奥普托欣试验和荚膜肿胀试验等；原液（精制多糖）检定，主要包括鉴别试验、固体总量、蛋白质含量、核酸含量、O-乙酰基含量、磷含量、糖醛酸含量、甲基戊糖含量、氨基己糖含量、总氮含量、分子大小或分子量分布、有机溶剂残留量和细菌内毒素检查等；半成品检定主要包括无菌检查等；成品检定按照检验类别一般分为物理检查、化学检定、有效成分检测和安全性试验。

和其它细菌多糖疫苗类似，肺炎球菌多糖疫苗的质量控制主要依赖于各种理化检验和一些涉及疫苗安全性的动物实验。由于无适当的动物模型，疫苗的剂量也是由抗原的含量而非生物活性所确定。主要需考虑的质控要点为：①抗原的鉴别和纯度，决定免疫的特异性；②免疫原性，主要通过理化方法测定多糖的分子大小，分子越大免疫原性越好；③安全性指标主要包括：细菌内毒素、蛋白质和核酸含量的测定。

糖醛酸含量测定法

1 原理

当荚膜多糖重复单位中存在糖醛酸基团时，可与吡啶-乙醇溶液发生显色反应，反应颜色深浅与反应体系中所存在的糖醛酸量直接成比例。将标准品（糖醛酸）稀释以制备一条多点（多个不同稀释度组成的）标准曲线。再将供试品稀释至该曲线范围之内。通过线性回归分析计算出样品中所含糖醛酸含量。

2 材料和设备

水浴锅，电子天平，移液器，紫外分光光度计，0.955%硼酸盐-硫酸溶液，0.125%吡啶-乙醇溶液，100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 糖醛酸标准溶液。

3 操作方法

3.1 供试品测定 精确量取 1ml 多糖供试品（含糖醛酸 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下）于玻塞试管中，一式二份，在搅拌状态下滴加 5ml 0.955%硼酸盐-硫酸溶液，加塞，于 100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 15 分钟，冷却至室温后，加 0.2ml 0.125%的吡啶-乙醇溶液，加塞，于 100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 15 分钟，冷却至室温后，于 530nm 波长处测定供试品的吸光度（A）值，同时以标准管中的空白管作为对照。

3.2 标准曲线制备 精确量取糖醛酸标准溶液 0、0.2、0.4、0.6、0.8 和 1ml 分别于玻塞试

管中，各管用注射用水补至 1ml（分别含糖醛酸为 0、10、20、30、40 和 50 $\mu\text{g/ml}$ ），同时以标准管中的空白管作为对照。其他操作同“3.1 样品测定”项。

4 计算

4.1 曲线方程建立 以各管相对应的吸光度（ A_{530} ）的值为纵坐标，以糖醛酸标准品含量 $\mu\text{g/ml}$ 数为横坐标，可得到一条标准曲线。

4.2 结果计算 将各供试品管吸光度（ A_{530} ）的值带入到曲线方程中，计算出供试品糖醛酸的含量，再以多糖干重计算出糖醛酸的百分含量。

5 结果与判定

各型多糖糖醛酸含量，应符合已批准的质量标准。

6 注意事项

6.1 硫酸需在通风橱中配制使用。

6.2 标准曲线相关系数（ r ）应不低于 0.99 或 R^2 不低于 0.985。

6.3 操作人员应做好防护措施。

起草人：陈琼 李康 李红

复核人：叶强

甲基戊糖含量测定法

1 原理

当荚膜多糖重复单位中存在甲基戊糖基团时，可与 L-半胱氨酸盐酸盐发生显色反应，反应颜色深浅与反应体系中所存在的甲基戊糖量直接成比例。将标准品（甲基戊糖）稀释以制备一条多点（多个不同稀释度组成的）标准曲线。再将供试品稀释至该曲线范围之内。通过线性回归分析计算出样品中所含甲基戊糖含量。

2 材料和设备

水浴锅，电子天平，移液器，紫外分光光度计，硫酸溶液，3%巯基丙氨酸（半胱氨酸）盐酸溶液，1mg/ml 甲基戊糖（鼠李糖）标准溶液。

3 操作方法

3.1 供试品测定 精确量取 1.0ml 多糖供试品（含甲基戊糖 20 $\mu\text{g/ml}$ 以下）于玻塞试管中，一式二份，于冰浴中，在连续搅拌下滴加 4.5ml 预冷的硫酸溶液，加塞，温暖试管至室温后，于 100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 分钟，冷却至室温，于各管中加 0.1ml 3%巯基丙氨酸盐酸溶液，混合均匀，加塞，置室温避光 2 小时，各管于 396nm 和 430nm 波长处测定吸光度 A 值，同时以标准管中的空白管作为对照。

3.2 标准曲线制备 精确量取 0、0.2、0.4、0.6、0.8 和 1ml 甲基戊糖标准溶液分别于玻塞试管中，各管补注射用水至 1ml，分别含 0、4、8、12、16 和 20 $\mu\text{g/ml}$ 甲基戊糖。同时以标准

管中的空白管作为对照。其他操作同“3.1 样品测定”项。

4 计算

4.1 曲线方程建立 以各管相对应的校正吸光度 ($A_{396}-A_{430}$) 的值为纵坐标, 以甲基戊糖标准品含量 ($\mu\text{g/ml}$) 为横坐标, 可得到一条标准曲线。

4.2 结果计算 将各供试品管校正吸光度 ($A_{396}-A_{430}$) 的值带入到曲线方程中, 计算出供试品甲基戊糖的含量, 再以多糖干重计算出甲基戊糖的百分含量。

5 结果与判定

各型多糖甲基戊糖含量, 应符合已批准的质量标准。

6 注意事项

6.1 样品测定中“在连续搅拌下滴加 4.5ml 预冷的硫酸溶液”此步注意搅拌均匀快速, 硫酸溶液需在冰水浴中预冷, 滴加过程中均匀缓速, 防止溶液过热。

6.2 硫酸和盐酸需在通风橱中配制使用。

6.3 标准曲线相关系数 (r) 应不低于 0.99 或 R^2 不低于 0.985。

6.4 操作人员应做好防护措施。

起草人: 陈琼 李康 李红

复核人: 叶强

氨基己糖含量测定法

1 原理

当荚膜多糖重复单位中存在氨基己糖基团时, 可与对二甲氨基苯甲醛溶液发生显色反应, 反应颜色深浅与反应体系中所存在的氨基己糖量直接成比例。将标准品 (氨基己糖) 稀释以制备一条多点 (多个不同稀释度组成的) 标准曲线。再将供试品稀释至该曲线范围之内。通过线性回归分析计算出样品中所含氨基己糖含量。

2 材料和设备

水浴锅, 电子天平, 移液器, 紫外分光光度计, 8mol/L HCl, 4mol/L NaOH 溶液, 酚酞指示液 (0.5% 酚酞乙醇溶液), 1mol/L Na_2CO_3 溶液, 乙酰基丙酮试剂, 二甲氨基苯甲醛溶液, 标准溶液 (600 $\mu\text{g/ml}$), 1mol/L HCl。

3 操作方法

3.1 供试品准备 稀释供试品使其氨基己糖含量小于 600 $\mu\text{g/ml}$ 。

3.2 水解 精确量取 1.0ml 供试品溶液, 于玻塞试管中, 加 1ml 8mol/L HCl, 加塞, 并于 100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴加热 1 小时。

3.3 中和 冷却水解液至室温, 加 40 μl 酚酞指示液, 混合均匀, 用 4mol/L NaOH 溶液中和水解溶液至紫红色, 然后滴加 1mol/L HCl, 直至溶液无色, 加注射用水至 10ml, 此为中性水解液。

3.4 显色测定 精确量取 1ml 中性水解液于玻塞试管中，一式二份，于各管中分别加 1ml 乙酰基丙酮试剂，加塞，于 90℃ 水浴（溶液温度）加热 45 分钟，冷却溶液至室温，各管中加入 2.5ml 乙醇，混合均匀，各管缓慢加入 1ml 二甲氨基苯甲醛溶液，混合均匀。补加乙醇至 10ml，混合均匀，加塞，于室温避光放置 1 小时，用 1cm 比色皿于 530nm 波长处测定吸光度值，同时以标准管中的空白管作为对照。

3.5 标准曲线 精确量取 0、0.2、0.4、0.6、0.8 和 1ml 标准溶液，分别于 20ml 玻塞试管中，各管补加注射用水至 1ml（分别含葡糖胺 0μg、120μg、240μg、360μg、480μg、600μg），以下操作同“3.2 水解”和“3.3 中和”步骤。各管中性水解液精确量取 1ml 分别于 20ml 玻塞试管中。以下操作同“3.4 显色测定”，同时以标准管中的空白管作对照。

4 计算

4.1 曲线方程建立 以各管相对应的吸光度（ A_{530} ）的值为纵坐标，以氨基己糖标准品含量（μg/ml）为横坐标，可得到一条标准曲线。

4.2 结果计算 将各供试品管吸光度（ A_{530} ）的值带入到曲线方程中，计算出供试品氨基己糖的含量，再以多糖干重计算出氨基己糖的百分含量。

5 结果与判定

各型多糖氨基己糖含量，应符合已批准的质量标准。

6 注意事项

6.1 标准曲线相关系数（ r ）应不低于 0.99 或 R^2 不低于 0.985。

6.2 操作人员应做好防护措施。

起草人：陈琼 李康 李红

复核人：叶强

23 价肺炎球菌多糖疫苗

1 原理

抗原和特异性抗体在琼脂糖凝胶介质中，有一定的盐离子存在下，两者相向扩散。当抗原与抗体扩散相遇，在合适的比例时会形成明显的沉淀线。从而对 23 价肺炎球菌多糖疫苗的特异性进行检查。

2 材料和设备

水平台，扩散用玻璃板，打孔器（3mm），湿盒，微波炉，移液器，培养箱，琼脂糖，23 种肺炎球菌抗血清，健康兔血清，考马斯亮蓝染色液，脱色液。

3 操作方法

3.1 制胶 称取一定量的琼脂糖，用 0.85%~0.9%氯化钠溶液溶解，制成终浓度 1%的琼脂糖溶液，微波炉加热至琼脂糖完全溶化。

- 3.2 制板 将溶化琼脂糖凝胶趁热（70℃以上）平铺一定厚度在水平玻璃板上，待凝固。
- 3.3 打孔 在凝固的琼脂糖凝胶玻璃板上，用打孔器打孔，孔间距离5~6mm。
- 3.4 供试品处理 用0.85%~0.9%氯化钠溶液将供试品制成50μg/ml多糖溶液。
- 3.5 加样 中心孔（或周围孔）加入供试品，周围孔（或中心孔）加入与多糖抗原相应的抗血清，加样量均为10μl。同时用健康兔血清作阴性对照，然后置于湿盒中。
- 3.6 扩散 将湿盒于37℃培养箱扩散12~24小时。
- 3.7 浸泡 将凝胶从玻璃板上轻轻取下，置于0.85%~0.9%氯化钠溶液浸泡2~3天，每天更换0.85%~0.9%氯化钠溶液。
- 3.8 染色 将浸泡后的凝胶用染色液染色10~20分钟。
- 3.9 脱色 取出凝胶置于脱色液中脱色，直至凝胶背景透明、沉淀线清晰为止。
- 3.10 制片保存 将完成脱色的凝胶固定在玻璃板上自然晾干，保存。

4 结果与判定

供试品周围孔与中心孔之间产生清晰的沉淀线，阴性对照无沉淀线产生，即肺炎疫苗只与相应抗血清之间产生沉淀线，而不与其他动物血清之间产生沉淀线者，判为合格。

5 注意事项

供试品和抗血清应临用前配制，注意防止降解或长菌。

起草人：陈琼 李康 李红

复核人：叶强

鉴别试验（二）——速率比浊法

1 原理

本方法所描述的是一种用来定性测定23价肺炎球菌多糖疫苗中各组成成分即各型别肺炎球菌多糖的免疫化学方法即速率比浊法。各型多糖通过与其各自的特异性抗体反应而得以鉴定。抗原-抗体复合物即聚集体所导致的光散射可通过速率比浊法来检测。当（抗原抗体反应）在过量抗体存在的条件下进行时，形成光散射聚集体的速率与反应体系中所存在的抗原量直接成比例。

在定性的鉴别试验中，根据肺炎球菌多糖可和其相同型别的抗血清反应而不与异型抗血清反应这一特性，来鉴定23价肺炎球菌多糖抗原同一性。

2 材料和设备

IMMAGE 800 免疫化学系统（以下称为速率比浊仪），涡旋振荡器，移液器，缓冲液，稀释液，洗液，抗血清，多糖标准品。

3 操作方法

3.1 仪器参数设置 根据血清和标准品来源不同设置不同的反应缓冲液体积，血清体积，样品体积和反应时间。

3.2 试剂配制

3.2.1 抗血清的配制：根据血清效价确定稀释倍数。

3.2.2 标准品临界点溶液的制备：将标准品稀释至适宜浓度作为临界点。

3.3 供试品准备（供试品每一血清型的理论浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ） 采用贝克曼公司稀释液，将样品稀释至适宜浓度。

3.4 标准品临界点溶液速率单位测定 将稀释好的抗血清置于左侧试剂盘，将标准品临界点溶液的架子放置于右侧试剂盘。在指定位置放置稀释液和缓冲液，检测其速率单位。

3.5 供试品速率单位测定 取下装有标准品临界点溶液的架子，换为装有供试品的架子，测定其速率单位。

4 结果与判定

疫苗所测出的各肺炎球菌多糖型别的速率单位应大于标准品临界点溶液的速率单位，鉴别试验合格。

5 注意事项

5.1 供试品和多糖标准品应临用前配制，注意防止降解或长菌。

5.2 稀释过程中采用多糖标准品、供试品和对照品体积均不小于 25 μl 。

起草人：陈琼 李康 李红

复核人：叶强

各型多糖含量测定法

1 原理

本方法所描述的是一种用来定量测定 23 价肺炎球菌多糖疫苗中各组成成分即各型别肺炎球菌多糖的免疫化学方法：速率比浊法。各型多糖通过与其各自的特异性抗体反应产生抗原-抗体复合物即聚集体所导致的光散射可通过速率比浊法检测出来。当抗原抗体反应在过量抗体存在的条件下进行时，形成光散射聚集体的速率与反应体系中所存在的抗原量直接成比例。将标准品（含有与供试品中所存在的型别相同的肺炎球菌多糖）稀释以制备一条多点（多个不同稀释度组成的）标准曲线。再将供试品稀释至该曲线范围之内。通过线性回归分析分别计算出供试品中所含 23 个不同血清型别的多糖含量。

2 材料和设备

IMMAGE 800 免疫化学系统（以下称为速率比浊仪），涡漩振荡器，移液器，缓冲液，稀释液，洗液，抗血清，多糖标准品，对照品。

3 操作方法

3.1 仪器参数设置 根据血清和标准品来源不同设置不同的反应缓冲液体积，血清体积，样品体积和反应时间。

3.2 试剂配制

3.2.1 抗血清的配制：根据血清效价确定稀释倍数。

3.2.2 标准曲线的制备：采用稀释液，将标准品稀释至适宜范围。

3.3 供试品准备（供试品每一血清型的理论浓度为 $50\mu\text{g/ml}$ ）采用贝克曼公司稀释液，将供试品稀释至适宜浓度。

3.4 对照品的配制 采用贝克曼公司稀释液，将对照品稀释至适宜浓度。

3.5 标准曲线的确定 将稀释好的抗血清置于左侧试剂盘。将装有标准品的架子放置于右侧。在指定位置放置稀释液和缓冲液。对各型血清进行定标。

3.6 供试品浓度测定 取下标准品架子，换为装有各浓度供试品的架子，每个供试品浓度测 2 次。

4 结果与判定

4.1 若得到一条无效的标准曲线（每个标准浓度的相关系数 <0.985 或 $\text{RSD}>10\%$ ），试验测定须重做。

4.2 对照品 23 个血清型中每个型别多糖含量必须在预设限值内。

4.3 供试品 23 个血清型中每个型别多糖含量须在 $35\sim 65\mu\text{g/ml}$ 范围。

5 注意事项

5.1 供试品、多糖标准品和对照品应临用前配制，注意防止降解或长菌。

5.2 稀释过程中采用多糖标准品、供试品和对照品体积均不小于 $25\mu\text{l}$ 。

起草人：陈琼 李康 李红

复核人：叶强

b 型流感嗜血杆菌结合疫苗

简 述

流感嗜血杆菌 (*H.influenzae*, Hi) 是人类急性呼吸道传染病的重要致病菌。其中，b 型流感嗜血杆菌 (*H.influenzae* type b, Hib) 能引起肺炎、脑膜炎等侵袭性疾病，在全球 5 岁以下的儿童中造成严重患病和死亡。预防 Hib 感染的主要措施是接种疫苗。细菌荚膜多糖是 Hib 的主要毒力因子，具有免疫原性，能在人体中诱发抗 Hib 的保护性抗体，因此可以被用来制备 Hib 疫苗。荚膜多糖疫苗在使用上有一定局限性，因为多糖抗原属 T 细胞非依赖性抗原，不能激活 TH 细胞，对 18 月龄以下婴幼儿没有保护作用。克服多糖疫苗局限性的措施是，将多糖与 T 细

胞依赖性蛋白抗原共价结合从而获得更有效的疫苗。目前获准用于预防 Hib 疾病的疫苗都是结合疫苗。Hib 疫苗的载体蛋白有 4 种：白喉类毒素（DT）、破伤风类毒素（TT）、无毒力的白喉毒素突变体（CRM197）和 B 群脑膜炎球菌外膜蛋白复合物（OMP）。与其他疫苗相比，PRP-DT 在小于 18 月龄儿童中的免疫原性较弱，已从市场上召回。Hib 疫苗有各种配方制剂，有液体注射剂型的，也有冻干粉针剂的；有含铝佐剂的，也有不含铝佐剂的；有单独的 Hib 结合疫苗，也有与百白破等其他疫苗组成的联合疫苗。

疫苗的质量控制是为了保证疫苗产品的安全、有效。对产品的相关质量控制应贯穿在疫苗生产全过程中，包括建立针对生产人员、使用的设备、原材料、生产工艺及生产环境等各方面的质量管理体系。对于 b 型流感嗜血杆菌结合疫苗，其生产过程中疫苗质量的监控应包括对疫苗生产用培养基、主种子和工作种子、培养过程、提取过程、结合过程、纯化过程、载体蛋白、原液、半成品、成品以及辅料等一系列的质量控制。

目前，《中国药典》2015 年版三部 b 型流感嗜血杆菌结合疫苗的多糖检定包括鉴别试验、固体总量、核糖含量、磷含量、蛋白质含量、核酸含量、多糖分子大小测定、细菌内毒素检查；多糖衍生物检定包括己二酰肼含量、氰化物残留量；结合物原液检定包括鉴别试验、多糖含量、蛋白质含量、多糖与蛋白质的比值、高分子结合物含量、多糖分子大小测定、碳二亚胺残留量、无菌检查、细菌内毒素检查；半成品检定包括无菌检查；成品检定包括鉴别试验、外观、装量、渗透压摩尔浓度、pH 值、氯化钠含量、多糖含量、高分子结合物含量、多糖分子大小测定、效力试验、无菌检查、热原检查、异常毒性检查、细菌内毒素检查，其中多糖含量、高分子结合物含量、多糖分子大小测定和效力试验为疫苗关键检测项目。以上各项均应按相应标准进行质量控制与检定，须符合规定。

效力检查法

1 原理

本法系用 b 型流感嗜血杆菌结合疫苗免疫小鼠，在规定时间内采集鼠血分离血清，采用酶联免疫法测定免疫小鼠血清中的 b 型流感嗜血杆菌荚膜多糖抗体，将免疫组小鼠血清的抗体水平与对照组相比较，计算免疫组的阳转率以判定疫苗免疫效果。

2 材料和设备

2.1 材料 BALB/c 小鼠或 NIH 小鼠（12~14g，同性），1ml 注射器，pH9.6 的 50mmol 碳酸盐/碳酸氢盐缓冲液，含 0.05%吐温 20 的磷酸盐缓冲液（PBST），胎牛血清，羊抗鼠 IgG，酶底物（TMB 或 OPD），1.5 mol/L H_2SO_4 ，0.85%~0.9%氯化钠溶液，包被用多糖抗原，牛血清白蛋白（BSA）。

2.2 设备 酶标仪。

3 操作方法

3.1 供试品处理 用 0.85%~0.9%氯化钠溶液稀释 b 型流感嗜血杆菌结合疫苗至 12.5 μ g 多糖/ml。

3.2 动物分组 将 12~14g 小鼠随机分为试验组和对照组，每组至少 10 只。

- 3.3 接种 每只小鼠于第 1 天、第 14 天皮下注射 2 次，对照组注射 0.85%~0.9%氯化钠溶液 0.2ml，试验组注射 0.2ml 含 2.5 μ g 多糖的疫苗。
- 3.4 采血 末次接种后 21~28 天采血，分离血清，-20 $^{\circ}$ C 以下保存待用。
- 3.5 包被抗原 用包被液稀释多糖抗原至 10 μ g/ml，包被 96 孔板，4 $^{\circ}$ C 过夜。
- 3.6 洗板 PBST 洗板 3 次。
- 3.7 封闭 每孔加入 150 μ l PBST-1%BSA，37 $^{\circ}$ C 孵育 2 小时。
- 3.8 洗板 PBST 洗板 3 次。
- 3.9 稀释血清 各孔加入 PBST 100 μ l 后在首孔分别加入用 PBST 稀释的试验组和对照组待检血清 100 μ l/孔，倍倍稀释，37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。
- 3.10 洗板 PBST 洗板 3 次。
- 3.11 加二抗 加入溶于 PBST-1%胎牛血清的羊抗鼠 IgG/辣根过氧化物酶，每孔 100 μ l，37 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟。
- 3.12 洗板 PBST 洗板 3 次。
- 3.13 加底物 加底物 (TMB 或 OPD)，每孔 100 μ l，室温避光 20 分钟。
- 3.14 终止反应 每孔加入 50 μ l 1.5 mol/L H₂SO₄ 终止反应。
- 3.15 读数 450 nm (TMB 底物) 或 490nm (OPD 底物) 读 OD 值。

4 结果计算

根据阴性对照组血清 OD 值计算临界值。临界值以制品批准的要求为准。

$$\text{阳转率}(\%) = \frac{\text{试验组抗体阳性的小鼠数}}{\text{试验组小鼠总数}} \times 100$$

5 结果与判定

试验组血清抗体 OD 值 \geq 临界值，即为抗体阳性。阳性率应符合批准的要求。

6 注意事项

- 6.1 小鼠皮下注射后应观察注射部位，不应有液体渗出。
- 6.2 每次洗板后应尽量将洗板液除净。
- 6.3 孔内加入血清后要立即进行倍倍稀释。
- 6.4 加入底物前要注意观察，已变色的底物不能使用。
- 6.5 配制 H₂SO₄ 时应遵照规定，并注意人员防护。

起草人：李茂光 李江姣

复核人：叶强

高分子结合物含量测定法

1 原理

本法系利用高分子结合物、低分子结合物及游离多糖在不同乙醇浓度下，沉淀分离，采用紫外-可见分光光度法测定磷含量，计算高分子结合物的含量。

2 材料和设备

2.1 材料 试管、玻璃珠、石英比色杯、50ml 圆底离心管、吸管（1ml、10ml）、移液器（200 μ l、1000 μ l、5000 μ l）。

2.2 设备 电子天平、离心机、紫外-可见分光光度计。

2.3 溶液配制

2.3.1 5mol/L NaCl 溶液：精密称定 NaCl 29.22g，加蒸馏水溶解并稀释至 100ml。

2.3.2 50%乙醇：精密量取无水乙醇 50ml，加蒸馏水至 100ml。

2.3.3 1mol/L NaOH 溶液：精密称定 NaOH 4g，加蒸馏水溶解并稀释至 100ml。

2.3.4 1mg/ml 磷标准贮备液：精确称取已干燥至恒重的磷酸二氢钾 439.3mg，加蒸馏水溶解，移入 100ml 量瓶中，稀释至刻度。

2.3.5 2.0 μ g/ml 磷标准工作液：取 1mg/ml 磷标准贮备液 0.5ml，置于 250ml 量瓶中，加水稀释至刻度，2~8 $^{\circ}$ C 储存 6 个月。

2.3.6 无机化试剂：浓硫酸-高氯酸（1：1）。

2.3.7 显色剂：现用现配。将 A 液倒入 B 液。

A 液：1.5mol/L H₂SO₄ 1 体积

2.5%（W/V）钼酸铵 1 体积

纯水 2 体积

B 液：10%（W/V）抗坏血酸 1 体积

3 操作方法

3.1 供试品处理 用蒸馏水将供试品稀释至适宜浓度（多糖含量约为 10~20 μ g/ml 为宜），使体积大于 5.0ml。混匀后取 3.0ml 用于分步沉淀，取 1.0ml 两份作为 S₁。

3.2 分步沉淀 向 3.0ml 样品中加 5mol/L 氯化钠溶液 0.75ml，混匀后加 15ml 无水乙醇混匀，-20 $^{\circ}$ C 放置 72~96 小时；5 $^{\circ}$ C \pm 3 $^{\circ}$ C，4500g 离心 90 分钟，吸取上清液为 S₂。

在沉淀中加 0.5ml 50%乙醇和 3~6 颗玻璃珠，震荡混匀后室温放 1 小时，然后加 1.5ml 50%乙醇溶液混匀后放置 2 小时。10 $^{\circ}$ C \pm 5 $^{\circ}$ C，4500g 离心 60 分钟，准确吸取 1.8ml 上清液为 S₃。

在沉淀中加 1mol/L 氢氧化钠溶液 0.5ml 震荡混匀后于室温放置 1 小时，加 1.25ml 纯水震荡混匀为 S₄。

分别取 1.0ml S₁、1.5ml S₂、0.7ml S₃、0.5ml S₄ 各两份，参照脑膜炎球菌疫苗 A 群脑膜炎球菌多糖测定法（改良陈氏法）测定 S₁、S₂、S₃ 及 S₄ 的磷含量。

4 结果计算

以磷标准品溶液的浓度对其相应的吸光度作直线回归，求得直线回归方程。将供试品溶液的吸光度代入方程，求出磷含量。

供试品磷含量（ μ g/ml）分别为：

$$S_1: P_1 = A_1 \times 3.0 / 1.0$$

$$S_2: P_2 = A_2 \times 18.75 / 1.5$$

$$S_3: P_3 = A_3 \times 2.0 / 0.7$$

$$S_4: P_4 = A_4 \times 2.0 / 0.5 - P_3 \times 10 / 100$$

高分子结合物含量(%) = $P_4 / (P_2 + P_3 + P_4) \times 100$

注：式中 P_1 、 P_2 、 P_3 、 P_4 为 S_1 、 S_2 、 S_3 、 S_4 的磷含量 ($\mu\text{g/ml}$)； A_1 、 A_2 、 A_3 、 A_4 为 S_1 、 S_2 、 S_3 、 S_4 中取样矿化后的磷含量 ($\mu\text{g/ml}$)。

5 结果与判定

试验有效性： $80\% \leq (P_2 + P_3 + P_4) / P_1 \leq 120\%$ 。

高分子结合物含量应符合批准的要求。

6 注意事项

6.1 吸取 S_2 、 S_3 时注意轻拿轻放，不要摇动沉淀。

6.2 离心前应使离心机预冷至适宜温度。

起草人：李茂光 李江姣

复核人：叶强

皮内注射用卡介苗

简 述

结核病是一种传染性疾病，严重威胁着人类的健康与生命，是全球十大死亡原因之一。卡介苗是目前唯一可用的能预防结核病的疫苗，卡介苗系经卡介菌培养后制成的活菌疫苗，卡介菌是法国医生 Albert Calmette 和兽医 Camille Guérin 用一株有毒的牛型结核分枝杆菌，自 1908 年开始经 13 年 239 次连续传代获得的减毒疫苗株，为纪念两位科学家的成就，1928 年法国国家科学大会将减毒的疫苗株命名为卡介苗 (Bacillus Calmette-Guérin, BCG)。自 1921 年应用于人体以来，已证实可预防结核病，尤其对儿童原发性结核病、血行播散性结核病及结核性脑膜炎有显著的预防效果，同时也是最安全的疫苗之一，目前全球每年约 1 亿儿童接种，我国每年约有 1000 万儿童接种卡介苗。

皮内注射用卡介苗检定应依据现行版《中国药典》或其他国家药品标准进行，并应符合相关要求。

皮内注射用卡介苗检定内容涉及种子批检定、原液检定、半成品检定及成品检定。成品检定项目总计 8 项，涉及生物制品常规的物理（外观、装量差异、渗透压摩尔浓度）检查、水分、纯菌检查 3 项，还有特异性检测项目 5 项，分别为鉴别试验、效力测定、活菌数测定、无有毒分枝杆菌试验、热稳定性试验。除装量差异、水分测定、活菌数测定和热稳定性试验外，其他试验需按标示量加入灭菌注射用水，复溶后进行其他各项检定。现分述特异性检测项目的标准

操作规范。

鉴别试验（一）（抗酸染色法）

1 原理

现行版《中国药典》中卡介苗（BCG）鉴别试验有两个方法，其中之一为抗酸染色法。

抗酸染色法原理系基于卡介苗为减毒牛型结核分枝杆菌，细菌形态为细长、稍微弯曲、两端圆形的杆菌，菌体细胞可分散或成团，属分枝杆菌属。分枝杆菌属为耐酸小杆菌，一般染色法不易着色，必须应用抗酸涂片染色法，则能看出菌的形态。抗酸性染色是鉴别分枝杆菌尤其是结核菌的重要方法之一，因此以抗酸染色法进行皮内注射用卡介苗菌体形态观察，通过显微镜观察细菌形态鉴别制品为分枝杆菌。但是该方法鉴别卡介苗无特异性，尤其无法区分卡介苗与有毒的分枝杆菌，如结核杆菌。

2 材料和设备

2.1 试剂 抗酸染液试剂：染色剂—0.8%石炭酸复红染液；复染剂—碱性美兰染液；脱色剂—3%盐酸乙醇液。制品复溶剂：注射用水或0.9%氯化钠溶液。

2.2 用具 载玻片、镊子、染色架、吸管、滤纸，酒精灯、火柴。

2.3 设备 显微镜。

3 操作方法

3.1 取一支供试品按标示量复溶，用稀释剂稀释为0.5mg/ml的菌液，取0.05ml放于载玻片上涂成直径约1cm的涂片。

3.2 涂片固定：待涂片在室温下自然干燥或在火焰上反复通过使细菌死亡并固定附着于玻片上避免染色时脱落。

3.3 染色：滴加石炭酸复红染液，用温火加热至染液冒蒸气为止，温度不宜过高，并随滴加染液以免干涸，维持2分钟左右冷却后，用流水缓缓冲去染液。

3.4 脱色：用3%盐酸乙醇液脱色至无红色脱下为止。约需1分钟，用水冲洗。

3.5 复染：用碱性美兰染液复染约1分钟水冲洗，用滤纸将染片印干，在显微镜的油镜下观察。

4 结果判定

卡介苗为耐酸杆菌呈红色，非耐酸杆菌呈蓝色。

起草人：赵爱华 付丽丽

复核人：魏东

鉴别试验（二）（多重PCR法）

1 原理

现行版《中国药典》中卡介苗（BCG）鉴别试验的第二个方法为多重PCR法，是针对抗酸

染色法无特异性的有效补充。

随着现代生物学技术及全基因组测序的发展,发现卡介菌在其最初的传代减毒培育过程中,丢失了很多与毒力及免疫原性相关的基因,与有毒分枝杆菌相比,有16个长度1903~12733 bp(碱基对)不等的缺失区域(Regions of Difference),这些区域被依次命名为RD1~RD16。其中,RD1最为特殊,存在于所有有毒分枝杆菌中,而所有的卡介苗亚株中均无RD1序列。通过检测RD1区存在与否,即可特异性鉴别BCG。同时不同的卡介苗亚株的缺失区、基因座上的串联重复序列(VNTR)及插入序列(IS)数目也有差异。通过分子生物学技术可以特异的鉴别BCG及其亚株,这也是世界卫生组织推荐的特异性鉴别方法。我国自1992年统一卡介苗生产菌种,国内卡介苗制品均来源于同一菌种,不存在多亚株卡介苗制品同时存在的情况,因此以检测BCG特异性缺失区RD1存在与否即可特异性鉴别卡介苗。

多重PCR法原理是在BCG特异性缺失区RD1的两侧及中部设计引物,若RD1区存在,此缺失区序列太长(RD1约9kbp),两侧引物不能有效结合,则中间和后端引物(ET2和ET3)有效结合,扩增出一条约150bp(测序结果为146bp)的核酸片段。当缺失RD1,则两侧引物(ET1和ET3)有效结合,扩增出一条约200bp(测序结果为193bp)的核酸片段。通过凝胶电泳指纹图谱很容易区分有毒的分枝杆菌和无毒的卡介苗,同时扩增产物与皮内注射用卡介苗特异性鉴别试验用国家参考品的扩增结果比对,二者的条带大小应一致。该方法同样也适用于皮内注射卡介苗种子批的特异性鉴别。

2 材料和设备

2.1 试剂 10 X PCR Buffer, dNTP Mixture(各2.5mmol/L), Taq 酶(5U/μl), 引物 ET1(10μmol/L) 5'-AAGCGTTGCCGCGCCGACCGACC-3', 引物 ET2(10μmol/L) 5'-CTGGC TATATTCCTGGGCCCCGG-3', 引物 ET3(10μmol/L) 5'-GAGGCGATCTGGCGGTTTGGGG-3', 6 X loading buffer 上样缓冲液, 灭菌超纯水, TAE 电泳缓冲液, 3%琼脂糖凝胶, DNA 分子量标记物为50bp DNA ladder, 核酸染料(EB或Gold view), 皮内注射用卡介苗特异性鉴别试验用国家参考品。

2.2 用具 1μl、10μl、20μl、200μl、1000μl加样器, 200μl、1.5ml EP管, 镊子、试管架、吸管等。

2.3 设备 离心机, 水浴系统、PCR仪, 电泳系统, 成像设备。

3 操作方法

3.1 模板制备 在生物安全柜中以医用酒精棉将一支供试品安瓿擦拭一遍,用锯刀稍锯一下,用手掰开安瓿,沿管壁缓慢加入1ml灭菌水,静置2~3分钟左右完全复溶后,用移液器将菌液移入至1.5ml EP管中,用微量离心机于12000r/min离心5分钟,可见EP管底部的菌体沉淀,以移液器吸弃上清液,留40~50μl液体重悬样品沉淀,将重悬样品置沸水浴10分钟,用微量离心机于8000r/min离心5分钟,取上清液作为多重PCR检测模板,震荡混匀,4℃保存备用。皮内注射用卡介苗特异性鉴别试验用国家参考品做相同处理。

3.2 多重PCR扩增 PCR反应体系总体积为50μl。即模板5μl, 10 X PCR Buffer 5μl, dNTP Mixture(各2.5mmol/L) 2μl, Taq 酶(5U/μl) 0.3μl, 引物 ET1(10μmol/L) 2μl, 引物 ET2(10μmol/L) 4μl, 引物 ET3(10μmol/L) 2μl, 加灭菌水至50μl。每个样品做两复管。

引物在使用前宜用微量离心机于 12000r/min 离心 1 分钟,再根据装量加入灭菌用水复溶至一定浓度,复溶后引物 4℃保存时间不宜超过 72 小时,超过 72 小时宜-20℃以下保存。阴性对照模板为灭菌水。

PCR 程序:94℃预变性 10 分钟,94℃变性 1 分钟、64℃退火 1 分钟、72℃延伸 30 秒,循环 30 次后,72℃再延伸 7 分钟。

3.3 PCR 产物鉴定 取 10μl PCR 产物加 2μl 6×Loading Buffer 均匀混合后上样于 3% Agrose 凝胶,3% Agrose 应加入一定量的核酸染料。电泳条件为 100V,100mA,时间 1 小时 20 分钟(琼脂糖凝胶长度偏短情况下,注意观察时间,可根据实际情况提前结束)。

以 50bp DNA ladder 分子量标记物为对照,观察 PCR 产物大小及扩增条带的数量,并与检测参考品比较。宜用成像设备记录结果。

4 结果与判定

供试品 PCR 扩增产物大小应与检测参考品一致。

5 注意事项

5.1 制备的模板 4℃保存时间不宜超过 24 小时,超过 24 小时宜超低温保存。

5.2 核酸染料 EB(溴化乙锭)是强诱变剂,并有重度毒性,在进行 PCR 产物鉴定时宜首选 Gold view,应用 EB 则务必带上手套,含 EB 的电泳溶液也应进行净化处理。

起草人:赵爱华 付丽丽

复核人:魏东

效力测定法

1 原理

卡介苗制品接种人体后诱导的细胞免疫反应是其预防结核病的关键因素,在卡介苗制品质量控制评价中,为了解所制造的卡介苗的效力情况,采用动物体内实验方法评价其诱导细胞免疫反应能力,其中以卡介苗免疫后可诱导动物机体产生细胞介导的迟发型变态反应(IV型变态反应)评价制品质量情况经济可行。

无特殊病原体的 PPD 阳性动物通过皮下免疫卡介苗活菌,即动物经卡介菌致敏,4~5 周后当再次皮下接种刺激原结核菌素纯蛋白衍生物(TB-PPD)或卡介菌纯蛋白衍生物(BCG-PPD)后,致敏 T 淋巴细胞由于受相同抗原再次刺激会释放出多种可溶性淋巴因子,导致血管通透性增加,巨噬细胞在局部集聚、浸润,可在注射局部形成以淋巴细胞和单核细胞浸润为主的硬结,通过测定其大小,可了解疫苗的效力。通常情况下,只有疫苗有效同时免疫成功,才能出现 PPD 反应,因此 PPD 试验能反应卡介苗接种后机体产生免疫反应的情况,作为疫苗免疫力的质控指标。

2 材料和设备

2.1 动物 体重 300~400g、结核菌素纯蛋白衍生物皮肤试验阴性(皮内注射 0.2ml,含

10IU) 同性 SPF 级豚鼠 4 只。

2.2 材料 1ml、2ml、5ml 注射器, 医用酒精棉, 剃刀, 游标卡尺, 注射用水, 结核菌素纯蛋白衍生物 (TB-PPD) 或和卡介苗纯蛋白衍生物 (BCG-PPD)。

3 操作方法

3.1 动物筛选 在体重 300~400g 同性豚鼠背部注射 0.2ml 含 10IU TB-PPD, 次日观察皮肤反应情况, PPD 试验阴性动物用于试验。

3.2 菌液制备 在生物安全柜中以医用酒精棉将供试品卡介苗安瓿擦拭一遍, 用锯刀稍锯一下, 用手掰开安瓿沿瓶壁缓慢加入 0.5ml 灭菌注射用水。放置 2~3 分钟使干燥体湿润后, 缓慢摇动使样品复溶, 集中所有样品, 待检供试品菌液浓度为 0.5mg/ml。

3.3 动物免疫

3.3.1 动物称重并做好标记后, 将豚鼠右腿与左腿侧皮肤上的毛剃去, 涂 75% 酒精消毒, 待酒精干后进行菌液注射。

3.3.2 将菌液摇匀, 于豚鼠左或右大腿皮下各注入 0.5ml, 共 4 只豚鼠。注射时左手食指及拇指捻起皮肤, 右手拿着吸好样品的注射器将针头刺入左手食指与拇指之间的部位, 缓缓注入样品后稍转动一下, 将针头拔出, 注射部位应凸起。

3.3.3 注射后, 立即写好动物卡片及记录。

3.4 效力测定 五周后在豚鼠背部注射 0.2ml 含 10IU PPD, 注射时用左手食指及拇指捻起皮肤, 右手拿好已吸好样品注射器, 皮肤呈平面注射针头斜面全部进入表皮, 局部皮肤隆起拔出针头稍转一下避免注射的样品外溢, 24 小时后观察局部硬结大小, 测量并记录。

4 结果计算

测量局部硬结的横径与纵径相加后计算均值即为硬结反应大小。

5 结果与判定

局部硬结反应不小于 5mm。

6 注意事项

6.1 必须是 PPD 试验阴性同性豚鼠。

6.2 注射前菌液要摇匀。

6.3 注射量要准确。

起草人: 赵爱华 付丽丽

复核人: 魏东

无有毒分枝杆菌检查法

1 原理

无有毒分枝杆菌试验是卡介苗制品重要的安全性试验, 因为结核分枝杆菌其形态与培养特

性与卡介苗基本一致,如果污染该菌用常规微生物方法无法区分,历史上曾发生误用结核分枝杆菌制造卡介苗疫苗,即德国吕伯克城(Lübeck)事件,曾一度阻碍了卡介苗的推广使用,检测卡介苗制品中无结核分枝杆菌成为卡介苗重要的安全性质控项目,每一批制品必须进行该项试验。豚鼠对有毒分枝杆菌高度敏感,可将菌苗注射豚鼠后观察动物是否有病变判断该菌苗是否污染有毒分枝杆菌或其他杂菌。选用结核菌素纯蛋白衍生物阴性 300~400g 同性豚鼠,每只豚鼠皮下给予相当于 50 次人用剂量的供试品,每 2 周称体重一次,观察 6 周,到期动物体重不得减轻,同时大体解剖观察动物脏器应无结核病变,若有动物死亡或有可疑病灶,应按《中国药典》中种子批该项要求进行试验。

2 材料和设备

2.1 动物 体重 300~400g 结核菌素纯蛋白衍生物皮肤试验阴性同性 SPF 级豚鼠 6 只。

2.2 材料 注射用水,结核菌素纯蛋白衍生物(TB-PPD),1ml、2ml、5ml 注射器,75%酒精棉。

2.3 设备 剃刀,镊子,剪刀等。

3 操作方法

3.1 动物筛选 在体重 300~400g 同性豚鼠背部注射 0.2ml 含 10IU PPD,次日观察皮肤反应情况,PPD 试验阴性动物用于试验。

3.2 菌液准备 在生物安全柜中以医用酒精棉将待检供试品卡介苗安瓿擦拭一遍,用锯刀稍锯一下,用手掰开安瓿沿瓶壁缓慢加入 0.1ml 灭菌注射用水。放置 2~3 分钟使干燥体湿润后,缓慢摇动使样品复溶,集中所有样品溶液,待检供试品菌液浓度为 2.5mg/ml。

3.3 动物免疫

3.3.1 动物称重并做好标记后,将豚鼠右腿与左腿侧皮肤上的毛用电动剃刀剃去,涂 75%乙醇消毒。

3.3.2 将菌液摇匀,分别注入豚鼠左或右大腿皮下各 0.5ml,共 6 只豚鼠。注射时左手食指及拇指捻起皮肤,右手拿着吸好样品的注射器将针头刺入食指与拇指之间的部位,缓缓注入样品后稍转动一下,将针头拔出,注射部位应凸起。

3.3.3 注射后,立即写好动物卡片及记录。

4 结果与判断

注射后每周观察 1 次注射部位及局部淋巴结的变化。每 2 周称体重一次。观察 6 周,动物体重不应减轻。6 周时进行大体解剖,检查肝、脾、肺等脏器应无肉眼可见的结核病变,即为合格。若动物死亡或有可疑病灶时,应作涂片和组织切片检查,并采取部分病灶磨碎,加少量 0.9%氯化钠溶液混匀,皮下注射 2 只豚鼠。若证明系结核病变,该菌苗即应废弃。试验经过应详细记录备查。若未满 6 周试验豚鼠因其他病患死亡应解剖检查,依上法处理(主要取脾脏磨碎,加少量 0.9%氯化钠溶液混匀,皮下注射 2 只豚鼠)。若死亡 1 只以上应加一倍量重试。

5 注意事项

5.1 必须是 PPD 试验阴性同性豚鼠。

5.2 注射前菌液要摇匀。

5.3 注射量要准确。

起草人：赵爱华 付丽丽

复核人：魏东

卡介苗活菌数（热稳定性试验）测定法

1 原理

卡介苗制品的活菌含量决定疫苗的效力，疫苗中含有足够数量的活菌是保证疫苗免疫成功发挥预防结核感染作用的重要因素，因此活菌数试验是卡介苗制品重要的质控指标，每一批制品必须进行该项试验。

卡介苗是活菌疫苗，活菌易受到环境温度的影响而导致活菌数改变，进而影响疫苗的质量，因此对制品进行热稳定性试验，用以评价疫苗的稳定性，评价时可将 37℃ 存放 28 天的样品与 2~8℃ 保存的同批疫苗同时进行活菌计数。

卡介菌本身为慢生长菌，了解卡介苗制品中活菌量，最适合的方法是采用固体培养，计数形成的肉眼可见的菌落形成单位（CFU），以此评价制品的活菌量，常用的固体培养基有骆氏鸡蛋培养基（LJ）、琼脂培养基（7H10，7H11），将卡介苗供试品接种后，采用的固体培养基应在 3~5 周时间长出肉眼可计数的菌落，国内目前均采用骆氏鸡蛋培养基。卡介苗活菌测定试验的结果重复性差，变异度高，为避免操作技术以及其他影响因素的存在，每次试验应采用已知活菌数范围的参考品对试验过程进行监测。

2 材料和设备

2.1 试剂 稀释苏通培养基、骆氏鸡蛋培养基、卡介苗活菌计数用国家参考品。

2.2 设备 操作台、生物安全柜，37℃ 培养箱，涡漩振荡器。

2.3 用具 一般用具：记号笔、酒精灯、试管架、锯刀、医用酒精棉、橡皮吸头、木盘。灭菌用具：中管，10ml 吸管，1ml 吸管，1ml 毛吸管，2 号橡皮塞，1ml 加样器，5ml 加样器，无菌 1ml、5ml tip 吸头。

3 操作方法

3.1 准备

3.1.1 供试品准备：取 20 支供试品，置 37℃ 进行 28 天加速破坏；加速破坏完成后取出。活菌数测定试验取加速破坏供试品 5 支，取同批号 2~8℃ 保存供试品 5 支、卡介苗活菌计数用国家参考品 2 支，编号后待测。

3.1.2 每批供试品准备骆氏鸡蛋培养基 10 支（2 个稀释度，每个稀释度 5 支），每支管壁上写明接种日期，样品编号，接种稀释度。

3.1.3 取灭菌中管（每批 6 支，样品管 1 支，稀释管 5 支），顺序排在试管架上，再在管壁上写上样品编号及稀释序号。

3.1.4 在火焰保护下，倒去骆氏鸡蛋培养基表面上的凝聚水。

3.2 供试品稀释 在二级生物安全实验室内进行操作。

3.2.1 稀释用管准备 用 10ml 吸管吸取稀释液放入第一管, 丢掉吸管底部 1ml, 第一管加入 4.0ml, 后 4 管分别加入 4.5ml。使用移液器则直接加入规定体积的稀释液。

3.2.2 供试品稀释 用酒精棉将 5 支持检样品安瓿各擦一遍, 用锯刀稍锯一下, 用手掰开安瓿, 将待检样品按标示量以稀释液复溶, 静置 2~3 分钟完全复溶后, 用毛吸管反复吹打混合均匀, 集中后稀释至适宜浓度 (0.5mg/ml), 移入样品中管置冰盒中待用。

3.2.3 接种液稀释 取稀释至适宜浓度的待检样品, 震荡 3~5 秒约 100 次后取 1ml 加入第一稀释管, 再从第一稀释管取 0.5ml 加入第二稀释管, 以此类推, 稀释至 10^{-5} 稀释度。

例: 取 1ml (0.5mg/ml 菌液) → 4.0ml 稀释苏通…… 10^{-1}

取 0.5ml 10^{-1} 菌液 → 4.5ml 稀释苏通…… 10^{-2}

取 0.5ml 10^{-2} 菌液 → 4.5ml 稀释苏通…… 10^{-3}

取 0.5ml 10^{-3} 菌液 → 4.5ml 稀释苏通…… 10^{-4}

取 0.5ml 10^{-4} 菌液 → 4.5ml 稀释苏通…… 10^{-5}

3.2.4 参考品稀释

3.2.4.1 稀释用管准备 用 10ml 吸管吸取稀释液放入第一管, 丢掉吸管底部 1ml, 第一管加入 2.0ml, 后 4 管分别加入 4.5ml。使用移液器则直接加入规定体积的稀释液。

3.2.4.2 参考品稀释 用酒精棉将 2 支持检样品安瓿各擦一遍, 用锯刀稍锯一下, 用手掰开安瓿, 按每支 0.5ml 加入稀释液, 静置 2~3 分钟完全复溶后, 用毛吸管反复吹打混合均匀, 集中菌液至样品中管中, 放入冰盒中待用。

取 (0.5mg/ml) 的参考品溶液, 震荡 3~5 秒约 100 次后取 0.5ml 加入 2.0ml 稀释苏通的第一稀释管, 再从第一稀释管取 0.5ml 加入第二稀释管, 以此类推, 稀释到 10^{-5} 稀释度。

例: 取 0.5ml (0.5mg/ml 菌液) → 2.0ml 稀释苏通…… 10^{-1}

取 0.5ml 10^{-1} 菌液 → 4.5ml 稀释苏通…… 10^{-2}

取 0.5ml 10^{-2} 菌液 → 4.5ml 稀释苏通…… 10^{-3}

取 0.5ml 10^{-3} 菌液 → 4.5ml 稀释苏通…… 10^{-4}

取 0.5ml 10^{-4} 菌液 → 4.5ml 稀释苏通…… 10^{-5}

3.3 接种

3.3.1 将样品的 10^{-4} 、 10^{-5} 两个稀释度, 分别接种 5 支骆氏鸡蛋培养基, 每支 0.1ml, 接种前在漩涡振荡器上振荡约 3~5 秒, 使其充分混匀后接种骆氏鸡蛋培养基。

3.3.2 接种后将骆氏鸡蛋培养基稍稍转动使菌苗均匀分配于斜面表面, 即使表面的菌液在培养基整体表面上摊平, 将培养管放在木盘内, 管口必须垫起约 1cm 高, 防止菌苗流至管口。

3.4 培养 接种菌苗的骆氏鸡蛋培养基在操作台内火焰的保护下, 换上无菌的 1 号或 2 号胶塞, 斜放在木盘内, 放 $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养箱培养, 4 周后开始计数。

3.5 热稳定试验 将疫苗于 37°C 放置 28 天进行加速破坏试验, 按同批号 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 保存供试品活菌计数同法操作, 进行活菌数测定。热稳定性试验在科室检验时限为 120 个工作日。

3.6 活菌计数 培养第 4 周后, 开始检查并记录各管生长的菌落数, 可到第 6 周止。以菌落生长比较均匀而能数清楚为准。计数 2 次。

4 结果计算

分别计数 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 供试品的 10^{-4} 、 10^{-5} 两个稀释度接种管生长的菌落数, 计算两个稀释度平

均生长的菌落数，两个稀释度菌落的平均数（将 10^{-4} 、 10^{-5} 两个稀释度的平均数之和除以 2）为活菌数结果。

热稳定性结果：分别计数 37°C 供试品的 10^{-4} 、 10^{-5} 两个稀释度接种管生长的菌落数，计算两个稀释度平均生长的菌落数，两个稀释度菌落的平均数（将 10^{-4} 、 10^{-5} 两个稀释度的平均数之和除以 2）为活菌数结果。

活菌率计算：将 37°C 活菌数结果与 4°C 活菌数结果进行比较，计算活菌率 [活菌率(%) = 37°C 活菌数 / 4°C 活菌数 $\times 100$]。

5 结果与判定

$2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 保存的供试品活菌数在 $1.0 \times 10^6 \text{CFU}/\text{mg}$ 以上为合格，每批供试品于 37°C 放置 28 天进行加速破坏试验测定活菌数，与 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 保存的同一批供试品同时进行比较，计算活菌率，放置 37°C 的供试品的活菌数应不低于同批号置 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 供试品的 25%，且不低于 $2.5 \times 10^5 \text{CFU}/\text{mg}$ 。

6 注意事项

6.1 在稀释过程中，每个稀释度必须更换一支吸管。

6.2 菌苗稀释中吸管来回上下吸 3 次，第 4 次再做为稀释或接种。

6.3 使用吸管稀释菌液和接种培养基时吸管底部 0.1ml 都废弃。若需用全部时一定要将吸管全部吹干净。

6.4 每一批供试品应做热稳定加速试验。活菌数测定与热稳定性试验同时进行，热稳定活菌率不用低于 25%。

6.5 活菌数国家参考品处理方式与结果计数同供试品，每次活菌数试验需带一批已知活菌数范围的参考品，用于监测试验过程的一致性，确认没有操作技术以及其他影响因素的存在。

6.6 卡介苗由于其疏水性及生产工艺易形成菌团的原因，稀释过程中与接种前应充分震荡混匀。

6.7 活菌质量控制时应进行趋势分析，其中上警戒限与下警戒限活菌数范围不应超过 4 倍。

6.8 采用的固体培养基应能在培养的 3~5 周长肉眼可见的菌落形成单位（CFU）。

6.9 参考品的活菌数结果应在已知活菌数范围内，否则应调查原因。

起草人：赵爱华 付丽丽

复核人：魏东

伤寒 Vi 多糖疫苗

简述

目前各国在使用的伤寒疫苗多数是 WHO 推荐使用的口服伤寒 Ty21a 活疫苗和伤寒 Vi 多糖疫苗。我国批准上市的是伤寒 Vi 多糖疫苗，该疫苗是由伤寒沙门菌 Ty2 株的荚膜多糖中提取纯化的 Vi 多糖制成的、单次注射免疫的亚单位疫苗。

伤寒 Vi 多糖疫苗成品的检定包括鉴别试验、物理检查、化学检定、无菌检查、异常毒性检查、热原检查和细菌内毒素检查等 6 大项。其中，物理检查包括外观、装量和渗透压摩尔浓度；化学检定包括 pH 值、防腐剂含量、多糖含量和 O-乙酰基含量。多糖含量是成品检定的重点。防腐剂含量在未添加防腐剂的产品中不必检测。其他项目为疫苗常规检定项目。

鉴别试验

1 原理

鉴别试验采用免疫双扩散法。本法系在琼脂糖凝胶板上按一定距离打数个小孔，在相邻的两孔内分别加入抗原与其特异性抗体，二者各自在琼脂糖凝胶中扩散。若抗原和抗体浓度、比例适当，则一定时间后，抗原与抗体在凝胶中相遇、结合形成免疫复合物，会出现沉淀线，以此对供试品的特异性进行检查。

2 材料和设备

2.1 供试品和抗原参考品溶液的制备 用无菌 0.9%氯化钠溶液将供试品和抗原参考品浓度分别稀释至 50~100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的某一浓度。

2.2 试剂和器材 兔抗伤寒 Vi 血清，兔抗伤寒 O 血清，加样器、玻板、琼脂糖、打孔器、湿盒、沸水浴等，37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱。

3 操作方法

将沸水浴完全溶胀的 1.5%琼脂糖-0.9%氯化钠溶液倾倒入水平玻板上（每平方厘米约 0.2ml 琼脂糖），凝固后，按图 1 方阵型打孔，孔径 3mm，孔距 3mm。中央孔加入伤寒 Vi 血清，周边孔分别加入供试品溶液和 1 孔抗原参考品溶液；同时另打一套同样方阵型孔，中央孔改加伤寒 O 血清，其余加样顺序同前。每孔加样 20 μl 。将凝胶板置水平湿盒中，37 $^{\circ}\text{C}$ 水平扩散 24~48 小时。

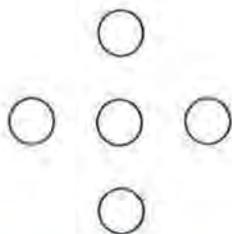


图 1 伤寒 Vi 多糖鉴别试验方阵型打孔图

4 结果观察与判定

在灯光下观察中间孔和周围孔间有无沉淀线。供试品应在 48 小时内与伤寒 Vi 血清形成明显沉淀线，而与伤寒 O 血清不形成沉淀线。

5 注意事项

5.1 抗原和抗体在合适比例的浓度下才能产生清晰的沉淀线。若实验结果发现沉淀线不清晰，则需要重新调整抗原或抗体的稀释度进行重试。

5.2 琼脂糖应充分融化，否则会形成凝胶局部结块，影响扩散。

5.3 湿盒应能保持湿度，以免沉淀线形成前凝胶干裂。

起草人：梁昊宇

复核人：曾明 王斌

多糖分子大小测定法

1 原理

伤寒 Vi 多糖疫苗的多糖分子大小是反映疫苗免疫原性的重要指标，多糖的大分子多聚体才具有免疫原性。由于在成品中，多糖含量较低，该指标难以检测，因而在原液中进行测定。

多糖分子大小测定是利用分子筛色谱的原理，小分子多糖在随流动相流动时落入色谱柱的填料——凝胶颗粒中，因而流动受阻，流动速度变慢，而大分子多糖随流动相直接由凝胶颗粒外流出，流速不受影响从而得以分离。收集不同保留时间的洗脱液，检测其中的多糖含量，即可算出多糖分子大小的分布。其中多糖含量的检测，《中国药典》三部附录中规定用测定 O-乙酰基的方法进行。

2 材料和设备

CL-4B 凝胶和玻璃色谱柱（1.5cm×100cm），流动相 [0.2 mol/L 氯化钠溶液（pH 7.0）]，蓝色葡聚糖 2000 和维生素 B₁₂ 混合液，标准色谱系统，O-乙酰基含量测定用试剂（详见 O-乙酰基含量测定法），紫外分光光度计，pH 计。

3 操作方法

3.1 CL-4B 凝胶的浮选 取 CL-4B 凝胶，加流动相 400ml，搅拌后静置 1 小时，倾去上层悬液。如此反复几次后，加流动相 200ml，抽去凝胶中的空气。

3.2 装柱 将 CL-4B 凝胶装入玻璃柱中成色谱柱（高约 90cm），用 2~3 倍柱床体积的流动相流洗（流速为 18ml/h），使柱床平衡。

3.3 标柱 取蓝色葡聚糖 2000 和维生素 B₁₂ 混合液，混匀后加在已平衡好的 CL-4B 凝胶柱上。用 0.2mol/L 氯化钠溶液以 18ml/h 的速度洗脱，用收集器收集洗脱液。于 260nm 监测各管的光吸收。得到的色谱图中第一峰为蓝色葡聚糖峰（空流体积 V₀），第二峰为维生素 B₁₂ 峰（柱床体积 V_i）。

3.4 多糖分配系数 K_D 值及回收率测定 多糖测定：取相应体积的多糖溶液加入色谱柱，用 0.2mol/L 氯化钠溶液以 18ml/h 的速度洗脱。用自动分布收集器收集洗脱液。

3.5 监测每管液体中 O-乙酰基的含量，O-乙酰基含量最高时的洗脱体积即为多糖主峰峰顶洗脱体积 V_e 。

3.6 多糖分配系数 K_D 的计算：根据下列公式计算得到 K_D 值。

$$K_D = \frac{V_e - V_o}{V_i - V_o}$$

3.7 $K_D \leq 0.25$ 时多糖回收率：根据上述公式计算 $K_D = 0.25$ 时的洗脱体积。

等体积合并 $K_D = 0.25$ (含 $K_D = 0.25$) 前的每管洗脱液并测定 O-乙酰基含量 (A_x)，同时等体积合并 V_i 至 V_o 间的每管洗脱液并测定 O-乙酰基含量 (A_i)。按下列公式计算 $K_D \leq 0.25$ 时的多糖回收率 (R_x)：

$$R_x(\%) = \frac{A_x}{A_i} \times 100\%$$

4 结果判定

多糖分子大小应符合标准规定。

5 注意事项

5.1 凝胶色谱柱可购买商品化的预装柱，也可用 CL-4B 填料自己装柱。

5.2 凝胶色谱柱在装好后和使用中均需注意不能有裂纹裂隙。

起草人：梁昊宇

复核人：曾明 王斌

多糖含量测定法

1 原理

伤寒 Vi 多糖抗原含量测定采用了免疫火箭电泳的方法。其原理是：Vi 多糖抗原在电场的作用下，在含有特异性伤寒 Vi 抗体的琼脂糖凝胶中向一个方向泳动，泳动时与抗体发生抗原抗体反应而形成沉淀，沉淀线呈火箭形状，因此得名。抗原的含量与火箭的峰高（泳动的距离）相关。用标准多糖做标准曲线，即可测得样品的多糖含量。如图 2。

2 材料和设备

- 2.1 伤寒 Vi 多糖参考品。
- 2.2 伤寒 Vi 诊断血清：效价 $\geq 1:320$ 。
- 2.3 稳压电泳仪。
- 2.4 水浴箱。



图 2 免疫火箭电泳法测定伤寒 Vi 多糖含量

- 2.5 37℃培养箱。
2.6 电子天平。
2.7 其他：平玻板、打孔器、吸管、移液器、卡尺、量筒等。
2.8 0.05mol/L 巴比妥缓冲液 (pH 8.6)。

巴比妥钠	10.3g
巴比妥	1.84g
蒸馏水	至 1000ml

2.9 脱色液

甲醇	450ml
乙酸	100ml
蒸馏水	450ml

2.10 染色液

考马斯亮兰 R250	0.5g
脱色液	200ml

完全溶解后用滤纸过滤备用。

2.11 0.05%溴酚兰指示剂

溴酚兰	0.05g
0.9%氯化钠溶液	100ml

3 操作方法

3.1 配胶 称取 0.5g 琼脂糖加入到 40ml 巴比妥缓冲液 (pH 8.6, 0.05mol/L) 中, 100℃ 水浴使琼脂糖完全溶化, 待冷却至约 56℃ 时, 加入伤寒 Vi 诊断血清 0.2~0.5ml (根据伤寒 Vi 诊断血清效价确定), 快速混匀后倾注于 12cm × 6cm 的洁净平玻板上。

3.2 打孔 待凝胶凝固后用直径 3mm 的打孔器在距平板底边 1.5cm 处打一排孔, 孔间距 ≥ 2mm。

3.3 加样

3.3.1 标准液稀释: 用 0.9%氯化钠溶液将伤寒 Vi 多糖参考品分别稀释成浓度为 6.25、12.5、25.0、50.0 和 100.0 μg/ml 的多糖标准液。

3.3.2 各浓度的多糖标准液依次加入相应孔中, 每孔 5 μl, 做好标记。

3.3.3 样品孔加入供试品 5 μl, 供试品做双孔。

3.3.4 留一孔加溴酚兰指示剂 5 μl。

3.4 电泳

3.4.1 电泳槽中加入巴比妥缓冲液作为电极缓冲液。

3.4.2 将加样后的凝胶板置于电泳槽中, 加样孔一侧与电泳仪负极相连, 两端用滤纸搭桥与电极缓冲液连接。

3.4.3 在 8V/cm 的电压下电泳至指示剂到达板前端。

3.5 洗胶及烤胶 将凝胶板从电泳槽中取出, 用 0.9%氯化钠溶液和蒸馏水各浸泡 1 小时后, 用滤纸覆盖凝胶板置 37℃ 培养箱烘干。

3.6 染色及脱色 烘干后的凝胶用考马斯亮兰染色液染色 15 分钟, 再用脱色液脱色至背景清晰。

3.7 结果计算

3.7.1 标准曲线绘制 准确测量各标准浓度的峰高，以其为纵坐标，以标准浓度的对数值为横坐标绘制标准曲线。标准曲线相关系数 $R^2 \geq 0.9$ 。

3.7.2 供试品多糖含量计算 准确测量供试品的峰高，代入标准曲线计算其浓度，两份供试品浓度的均值即为供试品的多糖含量。

4 注意事项

4.1 琼脂糖应充分融化，否则凝胶局部会形成结块，影响电泳。

4.2 向融化的琼脂糖溶液中加入 Vi 血清时应注意溶液温度，温度高则血清会被灭活，温度低则琼脂糖会凝结，可将溶液置于 56°C 水浴中。

4.3 免疫火箭电泳法依靠的是抗原抗体反应，因此除了电泳条件外，抗原和抗体的量应合适。当凝胶内抗体过量时，抗原泳动困难，火箭峰很短，甚至难以形成；当抗原过量时，抗原在凝胶内难以充分展开，火箭的头部为钝圆型，影响标准曲线峰高的测量。因此当更换新的 Vi 抗体时，应通过预实验判断加入抗体的量，以各浓度标准抗原都能形成尖的火箭峰为宜。

起草人：王斌

复核人：曾明

固体总量测定法

1 原理

固体总量测定是通过蒸发干燥去除供试品溶液中水分而计算其中固体物质总重量的测定方法。

2 材料和设备

称量瓶、加样器等，干燥箱，干燥罐，分析天平。

3 操作方法

3.1 取洁净称量瓶在规定温度干燥箱中干燥至恒重。注意：两次称重时间间隔需大于 1 小时；称重前称量瓶需盖好并在干燥罐内平衡至室温。恒重是指两次称量差异小于 0.3mg 。

3.2 供试品测定：精确量取一定体积供试品液，加入称量瓶中，半盖瓶口，放入干燥箱中，在规定温度干燥至恒重。

4 结果计算

根据供试品体积计算固体总量：

$$\text{固体总量 (mg/ml)} = \frac{\text{瓶和供试品的恒重} - \text{瓶的恒重}}{\text{供试品体积}}$$

起草人：梁昊宇

复核人：曾明 王斌

O-乙酰基含量测定测定法

1 原理

O-乙酰基在碱性羟胺溶液中,能生成含乙酰基的复合物,并与三氯化铁-盐酸溶液在酸性条件下作用,生成有色化合物并在 540nm 处有吸收峰,O-乙酰基含量与吸光度成正比,利用这一特征反应即可测定 O-乙酰基含量。

2 材料和设备

2.1 2mol/L 盐酸羟胺,冷处保存。

2.2 3.5mol/L 氢氧化钠。

2.3 4mol/L 盐酸 浓盐酸(相对密度 1.18)1份,加2份蒸馏水稀释。

2.4 0.37mol/L 三氯化铁($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$),溶解于 0.1mol/L 盐酸。

2.5 0.001mol/L 醋酸钠(pH 4.5)。

2.6 O-乙酰基标准品:2.5mmol/L 氯化乙酰胆碱溶液,含 O-乙酰基 2.5mmol/L。

精确称取已干燥至恒重的氯化乙酰胆碱 22.7mg,用 0.001mol/L 醋酸钠液(pH 4.5)溶解,移入 50ml 量瓶中,用 0.001mol/L 醋酸钠液稀释至刻度。

2.7 紫外分光光度计。

3 操作方法

3.1 供试品 精确量取供试品 1.0ml(含 O-乙酰基 0.5~2.5 μmol ,如其含量过高可稀释)置于试管中,加 2.0ml 新鲜配制的碱性羟胺溶液(等体积的 2mol/L 盐酸羟胺与 3.5mol/L 氢氧化钠混合,3 小时内可用),摇匀,于室温放置 4 分钟,加 4mol/L 盐酸 1.0ml,使 pH 为 1.2 ± 0.2 ,摇匀,加 0.37mol/L 三氯化铁 1.0ml,摇匀。同时作一样品空白,取供试品 1ml 于试管中,先加 4mol/L 盐酸 1.0ml,后加 2.0ml 碱性羟胺(即加酸与加碱性羟胺的次序颠倒),加三氯化铁等操作同上。

3.2 O-乙酰基标准品 精确量取氯化乙酰胆碱(或溴化乙酰胆碱)标准液 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0ml,分别置于试管中,加蒸馏水补至 1.0ml(标准管分别含 O-乙酰基 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 $\mu\text{mol/ml}$),其余操作同供试品,同时做标准管的空白,即做与上述浓度相同的系列标准管,只是加酸与加碱性羟胺的次序颠倒,其他操作均同。

3.3 测定上述各管溶液 540nm 波长的 OD 值。

4 计算

以标准管 O-乙酰基浓度为 X 轴,标准管 540nm 波长的 OD 值分别减去各自空白管 OD 值为 Y 轴,做出线性方程。供试品 540nm 波长的 OD 值减去其空白管 OD 值,带入线性方程求出供试品的 O-乙酰基含量。

5 注意事项

5.1 该法测 O-乙酰基含量时,供试品中可能会含有某些干扰物质,因此需要同时做反应

管和对照管，两者加酸和加碱性羟胺的次序不同，应注意。

5.2 测 OD 值时，比色杯内可能出现细小的气泡，应轻弹比色杯，待气泡排出到液面上以后再测定 OD 值。

起草人：梁昊宇

复核人：王斌

霍乱疫苗

简 述

目前国内上市的霍乱疫苗，为口服胶囊制剂，名称为口服重组 B 亚单位/菌体霍乱疫苗（肠溶胶囊，OCV 胶囊）。该疫苗系用霍乱弧菌、重组霍乱毒素 B 亚单位（CTB）工程菌分别接种微生物培养基，经培养、收获、纯化/浓缩、冻干，加入辅料乳糖和硬脂酸镁混合后灌装入肠溶胶囊制成，含乳糖、硬脂酸镁、肠溶明胶胶囊等辅料，不含防腐剂和抗生素。口服重组 B 亚单位/菌体霍乱疫苗（肠溶胶囊）在与单独制备的抗酸剂经过组合包装后，成为口服重组 B 亚单位/菌体霍乱疫苗（肠溶胶囊）儿童用剂型。

该霍乱疫苗的质量标准包括原材料的管理、种子库的建立、生产工艺过程的质量保证、原液、半成品和成品的检定内容和质量指标，并根据稳定性试验结果确立了有效期和存储条件。成品检测项目包括鉴别试验、外观、装量差异、崩解时限、干燥失重、CTB 含量测定、微生物限度、免疫力试验八项检定。其中免疫力试验已用酶标法检测动物血清抗体效价试验代替原有的动物攻毒试验，并已编入国家标准。该疫苗是口服肠溶胶囊制剂，与一般的注射剂疫苗在检定项目上有较大的不同。下面介绍该疫苗成品的一些特异性检定项目。

鉴别试验（一）（染色镜检）

1 原理

用革兰染色的方法，观察疫苗成分中灭活霍乱弧菌的菌体形态，以作鉴别。

2 材料和设备

- 2.1 显微镜（100 倍油镜，带成像系统）。
- 2.2 载玻片、小烧杯、接种环。
- 2.3 试剂 革兰染色液套装、生理盐水、香柏油。

3 操作方法

将1粒OCV胶囊内容物倒出,用生理盐水稀释至5ml,超声振荡溶解,静置2~5分钟,取上清液1滴涂布于载玻片上,固定。加结晶紫染液初染约1分钟,水洗。加碘液冲去残水,媒染约1分钟,水洗,甩尽残水,衬以白色背景,用酒精丙酮脱色液脱色至流出酒精刚刚无紫色为止(约20~30秒),立即水洗。加石炭酸复红染液复染1分钟,水洗。待干后镜检。

4 结果判定

镜下菌体应为革兰阴性弧菌。

5 注意事项

超声振荡溶解的目的是使成团的灭活霍乱弧菌分散开,但应调整合适的超声输出功率和时间,既保证菌体良好分散又防止超声功率过大导致菌体破碎。

起草人:董思国

复核人:曾明 王斌

鉴别试验(二)(免疫双扩散法)

1 原理

抗原及其特异性抗体分别在琼脂糖凝胶中扩散,二者相遇时能在凝胶上形成沉淀线。利用这一原理,可进行特异性抗体与抗原之间的相互鉴别。

2 材料与设备

2.1 试剂 0.9%氯化钠溶液、兔抗CTB血清、琼脂糖、氨基黑染色剂、乙醇冰醋酸脱色液。

2.2 仪器及用具 25ml移液管,1ml、200 μ l移液器及对应吸头,载玻片、3mm打孔器、染脱色盒,凝胶成像仪。

3 操作方法

3.1 供试品及对照品溶液制备。

3.1.1 供试品溶液:将1粒OCV胶囊内容物倒出,用0.9%氧化钠溶液稀释至25ml,混匀,溶解,10000转离心5分钟,将上清液吸出作为供试液。供试液保存于2~8 $^{\circ}$ C。

3.1.2 对照品溶液:将CTB对照品用0.9%氯化钠溶液稀释至60 μ g/ml。

3.1.3 兔抗CTB血清:用0.9%氯化钠溶液按效价稀释至相应浓度。

3.2 供试品检验 取加热至完全溶胀的1.5%琼脂糖-0.9%氯化钠溶液按约每平方厘米0.2ml加至载玻片上(例如:2.5cm \times 7.6cm载玻片上加3.6ml琼脂糖)。待其凝固后用3mm打孔器按图1打5个孔,直径3mm,孔距3mm。

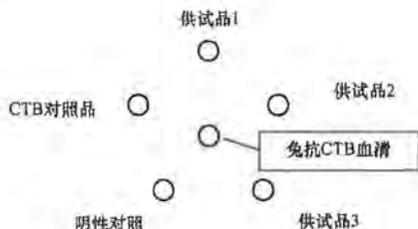


图1 霍乱疫苗检验打孔样图

在中间孔中加入兔抗 CTB 血清，在周围孔中分别加入供试品、CTB 对照品、阴性对照（生理盐水），加样量均为 $10\mu\text{l}$ 。将凝胶放入水平湿盒内， 37°C 扩散 24 小时。将凝胶放入 0.5% 氨基黑溶液中染色，用脱色液脱色至背景无色，沉淀线呈清晰蓝色为止。

4 结果判定

供试品和对照品均应与兔抗 CTB 血清产生沉淀线。

5 注意事项

5.1 如果沉淀线清晰可见，可不用染色。

5.2 琼脂糖应充分融化，否则会形成凝胶局部结块，影响扩散。

5.3 湿盒应能保持湿度，以免沉淀线形成前凝胶干裂。

5.4 抗原和抗体在合适比例的蛋白浓度情况下才能产生清晰的沉淀线。若实验结果发现沉淀线不清晰，则需要重新调整抗原或抗体的稀释度进行重试。

起草人：董思国

复核人：曾明 王斌

装量差异检查法

1 原理

分别称量一定数量的供试品及胶囊外壳，用减重法分别求出胶囊内容物的重量，计算供试品的装量差异。

2 材料和设备

电子天平（精度为 0.1mg ），小刷、吸耳球、棉签，弯头或平头手术镊子。

3 操作方法

取供试品 20 粒，分别精密称定重量后，依次放置于固定位置；分别取开囊帽，倾出内容物（不得损失囊壳）。用小刷或棉签将囊壳（包括囊体和囊帽）内外拭净。再依次精密称定囊壳的重量。计算得出每粒内容物的装量和平均装量。

4 结果判定

每粒内容物的装量与标示量比较,装量差异限度为 $\pm 10\%$,超出装量差异限度的不得多于2粒,并不得有1粒超出限度1倍。

起草人:董思国

复核人:曾明 王斌

崩解时限检查法

1 原理

崩解是固体药物在水中或人工胃液中崩散、变成细颗粒的过程。崩解时限检测人工模拟胃/肠环境下药物崩解的时间限度,是药物在人体胃/肠崩解速率的一个度量值,是固体药物的质量检查的指标之一。本疫苗为肠溶胶囊,应在人工胃液中不崩解而在人工肠液中崩解。

2 材料和设备

2.1 设备 智能崩解仪,电子天平(精度0.01g),酸度计(精度0.01)。

2.2 试剂

2.2.1 盐酸溶液(9→1000):量取9ml浓盐酸溶于800ml水中,加水稀释至1000ml。

2.2.2 0.1mol/L 氢氧化钠溶液:取澄清的氢氧化钠饱和溶液5.6ml,加新沸过的冷水使成1000ml,摇匀。

2.2.3 人工肠液:取磷酸二氢钾6.8g,加水500ml,用0.1mol/L氢氧化钠溶液调节pH值至6.8;另取胰酶10g,加水适量使溶解;将两液混合后,加水稀释成1000ml,即得。

3 操作方法

3.1 盐酸溶液(9→1000)内检查 取供试品胶囊6粒,分别置于吊篮的玻璃管内,每管不加挡板,将吊篮通过崩解仪上端的不锈钢轴悬挂于金属支架上,浸入盛有盐酸溶液(9→1000)的1000ml烧杯中,并调节吊篮位置使其下降时筛网距烧杯底部25mm,烧杯内水位高度使吊篮上升时筛网在水面下15mm处。设定温度为37℃,时间为2小时,启动崩解仪进行检查。

3.2 人工肠液内检查 将吊篮从(9→1000)盐酸溶液中取出,用少量水洗涤后,每管各加入挡板一块,保持37℃温度不变,时间设定为1小时,按上述方法操作,在人工肠液中检查。

4 结果判定

6粒胶囊在盐酸溶液中检查2小时,每粒均不得出现囊壳裂缝或崩解现象;然后在人工肠液中检查1小时,应全部崩解。如有1粒不能完全崩解,应另取6粒复试,均应符合规定。

起草人:董思国

复核人:曾明 王斌

干燥失重测定法

1 原理

干燥失重是检测供试品在规定的温度下，经加热干燥脱水至恒重后所减少的重量，通常以百分率表示。

2 材料和设备

称量瓶，电热恒温干燥箱（控制精度 $\pm 1^{\circ}\text{C}$ ），干燥器（普通），电子天平（精度 0.1mg ）。

3 操作方法

扁形称量瓶于 80°C 电热恒温干燥箱中干燥至恒重。取 OCV 胶囊 15 粒，将帽、体分开，倾出内容物，混匀。取内容物样品约 1.0g ，置于已恒重的扁形称量瓶中，精密称定样品质量。于 80°C 电热恒温干燥箱中干燥至恒重，称量其重量。

4 结果计算

干燥失重 = (内容物加样重量 - 干燥恒重后的内容物重量) / 内容物加样重量 $\times 100\%$

5 结果判定

减失重量应不得超过 5.0% 。

起草人：董思国

复核人：曾明 王斌

霍乱毒素 B 亚单位 (CTB) 含量测定法

1 原理

CTB 在含有 CTB 抗体的琼脂糖凝胶中逐步扩散，能与 CTB 抗体结合形成扩散圈，扩散圈直径的大小与 CTB 含量成正比。利用这一特性，用已知浓度的 CTB 对照品与供试品在凝胶中进行同样条件下的免疫扩散，参照对照品的浓度和扩散圈直径的关系，量出供试品的扩散圈直径，即可计算供试品的 CTB 浓度，从而算出供试品的 CTB 含量。

2 材料和设备

2.1 试剂 0.9%氯化钠溶液、0.5%考马斯亮蓝 R250 染色液、乙醇冰醋酸脱色液、兔抗 CTB 血清、琼脂糖。

2.2 仪器及用具 25ml 移液管，1ml、200 μl 移液器及对应吸头，制胶模具、250ml 锥形瓶、3mm 打孔器、湿盒、滤纸， 37°C 培养箱、凝胶成像仪，Coreldraw 测量软件或量尺。

3 操作方法

3.1 供试品及对照品溶液制备

3.1.1 供试品溶液：取胶囊 10 粒，逐粒倒出全部内容物于离心管中，分别加入 25ml 0.9% 氯化钠溶液，室温溶解 4 小时以上或 2~8℃ 溶解过夜。

3.1.2 对照品溶液：用 0.9% 氯化钠溶液将霍乱毒素 B 亚单位对照品系列稀释溶液稀释至 10~40μg/ml。

3.2 供试品检测

3.2.1 称取 0.2g 琼脂糖加于 25ml 0.9% 氯化钠溶液中，加热使之溶化。待此溶液温度降至 50~60℃ 时，加入兔抗 CTB 血清约 25μl（依据抗体效价可适当调整），混匀，倾注于 12cm×6cm 大小洁净玻璃板（制胶模具）上。

3.2.2 待琼脂糖冷却后，用直径 3mm 的打孔器打孔。

3.2.3 取 20 粒供试品的平均装量（见装量差异项）溶于 5ml 0.9% 氯化钠溶液中制成供试品溶液。取上述溶液 10μl 加到打好的琼脂糖凝胶孔中，做双样。同时将霍乱毒素 B 亚单位对照品作系列稀释至 50μg/ml、40μg/ml、30μg/ml、20μg/ml、10μg/ml 后各取 10μl 加到打好的琼脂糖凝胶孔中，也做双样。

3.2.4 将琼脂糖凝胶板放入湿盒中置于 37℃ 培养箱，24 小时后取出，将玻璃板上的凝胶小心转移到滤纸上，包裹后置于 37℃ 培养箱烘干。干胶用 0.5% 考马斯亮兰染液常规染色、脱色。用软件或量尺测量扩散圈的直径。

4 结果计算

分别以对照品浓度的对数对扩散圈直径均值做直线回归，将供试品溶液沉淀圈的直径均值代入回归方程中计算其 CTB 的浓度，再根据供试品制备时的稀释倍数推算供试品 CTB 含量。

5 结果判定

CTB 含量应为标示量的 100%~200%。

6 注意事项

6.1 琼脂糖应充分融化，否则凝胶局部会形成结块，影响扩散。

6.2 向融化的琼脂糖溶液中加入兔抗 CTB 血清时应注意溶液温度，温度高则血清会被灭活，温度低则琼脂糖会凝结，可将溶液置于 56℃ 水浴中。

6.3 兔抗 CTB 血清根据批次不同，可能会有效价变化，添加量也可适当调整，以扩散圈边界清晰，大小合适（最大圈直径在 13mm 左右）为宜。

6.4 打孔的孔间距应足够，以免各孔的扩散圈重叠。

6.5 湿盒应能保持湿度，以免凝胶干裂。

6.6 凝胶烘干后，如与滤纸粘连，可整体泡入纯水中，即能分离二者。

起草人：董思国

复核人：曾明 王斌

微生物限度检查法

1 原理

对于非规定灭菌的药品，标准允许在规定范围检出一定限量的微生物，但不得检出某些控制菌。本疫苗为口服胶囊制剂，利用培养计数法测定微生物限度，不同的培养基对应不同的检测目标微生物。

2 材料和设备

- 2.1 刻度吸管、90mm 无菌平皿。
- 2.2 电子天平：精度 0.1mg。
- 2.3 1ml 移液器、1ml 无菌吸头。
- 2.4 超净工作台。
- 2.5 恒温培养箱：控制精度 $\pm 1^{\circ}\text{C}$ 。
- 2.6 胰酪大豆胨琼脂培养基、沙氏葡萄糖琼脂培养基、pH 6.8 无菌磷酸盐缓冲液、麦康凯液体培养基、胰酪大豆胨液体培养基、麦康凯琼脂培养基。
- 2.7 TSA 增菌培养基（55mm 和 90mm）。

3 操作方法

3.1 供试品溶液制备：称取供试品 10g，加入 pH 6.8 无菌磷酸盐缓冲液至 100ml，混匀，作为 1:10 供试品溶液。

3.2 细菌数计数：取 1:10 供试品溶液 1ml 于 90mm 无菌平皿中，注入约 25ml 温度不超过 40°C 的溶化的胰酪大豆胨琼脂培养基，混匀，凝固，至少制备 2 个计数平皿。平皿于 $34^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 5 天。

3.3 霉菌和酵母菌计数：取 1:10 供试品溶液 1ml，注入约 25ml 温度不超过 40°C 的溶化的沙氏葡萄糖琼脂培养基，混匀，凝固，至少制备 2 个计数平皿。平皿于 $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 7 天。阴性对照：取 pH 6.8 无菌磷酸盐缓冲液 1ml，倾注胰酪大豆胨琼脂培养基，同法操作倾注沙氏葡萄糖琼脂培养基，每种培养基平行制备两块计数平皿。

3.4 控制菌（大肠埃希菌）检查：取 1:10 供试品溶液 10ml（相当于供试品 1g）直接接种于 100ml 胰酪大豆胨液体培养基中， $34^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 18~24 小时后，取上述培养物 1ml 接种于麦康凯液体培养基中， $43^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 24~48 小时，取麦康凯液体培养基培养物划线接种于麦康凯琼脂培养基平板上， $34^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 18~72 小时。若麦康凯琼脂培养基平板上没有菌落生长，或虽有菌落生长但鉴定结果为阴性，判定供试品未检出大肠埃希菌。另取 pH 6.8 无菌磷酸盐缓冲液 10ml 同法做阴性对照。

3.5 阳性对照：加菌量为不大于 100CFU 的大肠埃希菌，方法同供试品的控制菌检查。阳性对照试验应检出相应的控制菌。

4 结果计算

上述菌落计数试验中，供试品加样量为 0.1g，应据此推算每 1g 供试品细菌数。若平皿计

数时对供试品进行了稀释,则结果需再乘以稀释倍数。控制菌检查试验中供试品实际加样量为1g,结果为有/无的定性结果。

5 结果判定

每1g供试品细菌数不得超过1000个,霉菌和酵母菌不得超过100个,不得检出大肠埃希菌。

6 注意事项

6.1 平皿计数时,平皿中菌落数应在300个以内,如供试品细菌菌落数超过300,则用pH6.8无菌磷酸盐缓冲液稀释后平皿计数。

6.2 为加快成品胶囊溶解速度,可采用保温不超过40℃的pH 6.8无菌磷酸盐缓冲液加速溶解。

起草人:董思国

复核人:曾明 王斌

免疫力试验

1 原理

该疫苗的免疫力试验是以疫苗免疫小鼠,利用间接ELISA方法分别检测被免疫小鼠体内的CTB抗体和霍乱弧菌抗体效价,以反映疫苗所含成分在动物体内刺激产生抗体的能力。

2 材料和设备

2.1 实验动物:10~12g昆明小鼠。

2.2 试剂:5μg/ml的CTB溶液、20亿菌/ml霍乱菌体溶液、包被缓冲液(0.05mol/L碳酸盐缓冲液,pH 9.6)、磷酸盐缓冲液(pH 7.4)、小牛血清、吐温20、封闭液(10%小牛血清-0.1%吐温20-PBS,pH 7.4)、酶标二抗稀释液(5%小牛血清-0.1%吐温20-PBS,pH 7.4)、羊抗鼠IgG-HRP、TMB显色液、终止液(1mol/L H₂SO₄)。

2.3 仪器及用具

2.3.1 恒温培养箱,控制精度±1℃。

2.3.2 酶标仪和洗板机。

2.3.3 酶标板、一次性注射器、弯头镊、2ml无菌离心管、1000μl移液器、200μl移液器、10μl移液器,12道300μl等移液器及相应的吸头。

3 操作方法

3.1 动物免疫 取供试品胶囊内容物,用磷酸盐缓冲液(pH 7.4)稀释至每1ml含菌 1.0×10^9 个,免疫体重10~12g小鼠至少10只,每只腹腔注射2次,每次0.5ml(含菌 5.0×10^8 个),间隔7天;对照组注射液为磷酸盐缓冲液(pH 7.4)。末次免疫后3~7天眼窝取血,分离血清并将免疫组各只小鼠血清和对照组各只小鼠血清分别等量混合。

3.2 血清稀释 用含 10%小牛血清和 0.1%吐温 20 的磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 将上述血清分别稀释 400 倍待用。

3.3 间接 ELISA 检测 酶标板包被及加样可参考示意图 1。

表 1 酶标板包被及加样

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A				400				1600				
B				800				3200				
C	对照组			1600				6400			对照组	
D				3200				12800				
E				6400				25600				
F				12800				51200				
G	空白			25600				102400			空白	
H				51200				204800				
	霍乱弧菌抗体						CTB 抗体					

3.3.1 包被酶标板: 用包被缓冲液分别制备 20 亿菌/ml 的霍乱菌体溶液和 5 μ g/ml 的 CTB 溶液, 各包被半块酶标板 (如酶标包被示意图)。每孔包被 100 μ l, 4 $^{\circ}$ C 放置过夜 (16~18 小时)。

3.3.2 洗板: 用 PBS-吐温 20 (pH 7.4) 洗三次, 每次 300 μ l/孔, 拍干。

3.3.3 封闭: 每孔加入封闭液 200 μ l, 37 $^{\circ}$ C 封闭 2 小时。如上洗板。

3.3.4 加样

3.3.4.1 供试品组小鼠血清检测: 抗菌抗体检测 400 倍稀释起, CTB 抗体检测 1600 倍稀释起, 如表 1 所示从上到下做倍比稀释 (用封闭液)。抗菌/CTB 抗体检测小鼠血清加样 4 孔平行, 每孔 100 μ l。

3.3.4.2 对照组小鼠血清检测: 抗菌/CTB 抗体检测均 400 倍稀释, 如加样示意图所示加样, 抗毒/CTB 抗体检测小鼠血清加样 10 孔平行, 每孔 100 μ l。

3.3.4.3 空白对照: 如表 1 所示, 用封闭液做 6 孔空白对照, 每孔 100 μ l。

3.3.5 加样完成, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。如上洗板。

3.3.6 加酶标抗体: 加辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG-HRP (稀释比例参考抗体说明书, 用酶标二抗稀释液稀释), 100 μ l/孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。如上洗板 6 次。

3.3.7 显色: 加 TMB 显色液, 100 μ l/孔, 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 分钟。每孔加 50 μ l 终止液终止反应。

3.3.8 读数: 用酶标仪在波长 450nm 处测定 OD 值。

4 结果计算

取对照组小鼠血清 OD 值的均值 (X) + 3SD 结果与免疫组各稀释度的 OD 值相比较, 选取免疫组小鼠血清系列稀释度中 OD 值大于对照组 X + 3SD 的最大稀释倍数, 以此最大稀释倍数

除以对照组血清稀释倍数得到免疫组小鼠抗体滴度倍数。

5 结果判定

与对照组小鼠血清相比,免疫组小鼠霍乱弧菌抗体(抗菌抗体)滴度应不低于对照组4倍,免疫组小鼠CTB抗体(抗毒抗体)滴度应不低于对照组8倍。

6 注意事项

6.1 供试品疫苗溶液中灭活霍乱弧菌不溶于水且易沉淀,免疫过程中应不时摇晃供试品溶液以保证菌体处于悬浮状态。

6.2 小鼠眼眶取血操作应经过训练,以免采血不足或出现溶血。

6.3 采用多道移液器对血清进行倍比稀释时,应注意上紧加样头以使各通道吸取体积相同,保证各通道倍比稀释的一致性。

6.4 由于洗板和加样操作步骤较多,对照组孔有被污染导致结果异常的风险,因此试验操作应谨慎小心,试验用器具应清洁、干净。

起草人:董思国

复核人:曾明 王斌

皮上划痕用鼠疫活疫苗

简 述

鼠疫疫苗 [Plague Vaccine (Live) for Percutaneous Scarification] 是由鼠疫杆菌的弱毒菌株经培养后用稳定剂收集菌体,冻干制成。我国于1954年自前苏联引进鼠疫杆菌弱毒株EV株,采用皮下注射接种,但在使用中发现副作用极大,于1960年改为皮上划痕接种,在上臂外侧三角肌上部附着处皮上划痕接种,接种部位滴加疫苗。该疫苗主要接种对象是疫区或通过疫区的人员及从事鼠疫研究的工作人员。

鼠疫疫苗检定应依据《中国药典》或其他经批准的国家药品标准进行测定,并应符合相关要求。

鼠疫疫苗的检定内容按照生产阶段分为原液检定、半成品检定及成品检定。其中原液检定包括纯菌检查、浓度测定;半成品检定包括纯菌检查;成品检定项目包括鉴别试验、物理检查(外观、装量差异)、水分、纯菌检查、菌落和菌形检查、浓度测定、活菌数测定、效力测定、特异性毒性检查。特异性检测项目主要包括鉴别试验、纯菌检查(噬菌体裂解试验)、浓度测定、活菌数测定、特异性毒性检查。特异性检测项目的标准操作规范如下:

鉴别试验

1 原理

噬菌体具有溶菌作用和严格的种型特异性,能够对宿主菌产生特异性裂解。利用噬菌体裂解特性,对鼠疫疫苗进行鉴别试验分析。

2 材料和设备

2.1 材料 鼠疫噬菌体国家参考品(编号 230031),0.9%氯化钠溶液,脑心琼脂或厚氏琼脂培养基等适宜平皿,1ml 移液器及吸头,接种环。

2.2 设备 培养箱。

3 操作方法

取 1 支供试品,开启后加入 0.5ml 0.9%氯化钠溶液,用接种环取菌液涂于琼脂培养基上,滴 1 滴鼠疫噬菌体,然后将平皿倾斜,使噬菌体在培养基上流过,置 28℃培养 44~48 小时后观察裂解情况。

4 结果判定

噬菌体流过处无本菌生长。

5 注意事项

噬菌体裂解带应宽于噬菌体流经宽度。

起草人:魏东 张圆圆

复核人:赵爱华

纯菌检查法(噬菌体裂解试验)

1 原理

现行版《中国药典》中鼠疫疫苗纯菌检查试验包括两个方法:直接接种方法和噬菌体裂解方法。其中噬菌体裂解方法为 2015 年版《中华人民共和国药典》新增加的方法。由于活疫苗制剂中高浓度的活菌对可能存在的污染菌具有抑制作用,直接接种方法对活疫苗中少量的污染菌存在漏检可能。利用噬菌体特异性裂解作用,将噬菌体与活疫苗混合后进行接种培养,由于疫苗本菌被噬菌体裂解,如有污染菌落易被发现。

2 材料和设备

2.1 材料 鼠疫噬菌体国家参考品(编号 230031),0.9%氯化钠溶液,营养琼脂培养基平皿,200 μ l 移液器及吸头,1.5ml 离心管,“L”型涂布棒,封口膜,革兰染液。

2.2 设备 培养箱。

3 操作方法

取 1 支供试品, 开启后加入 0.5ml 0.9%氯化钠溶液复溶, 取 120 μ l 菌液与 120 μ l 噬菌体在 1.5ml 离心管中混合, 接种于 2 个营养琼脂培养基平皿, 每个平皿各接种 100 μ l, 用涂布棒涂匀, 分别置 20~25 $^{\circ}$ C、30~35 $^{\circ}$ C 培养 44~48 小时后观察结果。同时取菌液作阳性对照, 取 0.9%氯化钠溶液作阴性对照。

4 结果判定

应无杂菌生长。

如有细菌生长, 应与阳性对照菌同时进行革兰染色镜检, 若经确认为本菌, 判供试品符合规定。

如阳性对照平皿无细菌生长或阴性对照平皿有菌生长, 则试验无效, 应取同量供试品重试。

5 注意事项

每批样品需更换移液器吸头及涂布棒。

起草人: 魏东 张圆圆

复核人: 赵爱华

浓度测定法

1 原理

一定浓度范围内, 溶液的吸光度值与其浓度呈线性关系。取代表低、中、高三个菌液浓度的浓度测定通用参考品, 测定 600nm 吸光度值, 以参考品的浓度值和其相应的吸光度值作直线回归, 求得直线回归方程。同时测定适当稀释后待检样品的 600nm 吸光度值, 带入方程求出供试品浓度。

2 材料和设备

2.1 材料 皮上划痕用鼠疫、布氏、炭疽活疫苗浓度测定通用参考品(编号 230035), 0.9%氯化钠溶液, 1% (ml/ml) 甲醛溶液, 中管, 1ml 毛吸管, 1ml、5ml 移液器及吸头, 石英比色皿 (1cm)。

2.2 设备 紫外分光光度计, 培养箱。

3 操作方法

3.1 取 3 支供试品, 开启后每支加入 0.5ml 0.9%氯化钠溶液, 复溶后合并于中管内。

3.2 取 0.5ml 菌液加入 4.5ml 1% (ml/ml) 甲醛 0.9%氯化钠溶液 (10 倍稀释), 37 $^{\circ}$ C 孵育 40 分钟。

3.3 取 2.0ml 10 倍稀释菌液加入 2.572ml 0.9%氯化钠溶液 (共 22.86 倍稀释)。

3.4 参数设定: 波长为 600nm, 狭缝宽度为 2.0nm。先以 0.9%氯化钠溶液调零, 然后测定浓度测定通用参考品及 22.86 倍稀释菌液的 600nm 吸光度值。

4 结果计算

以参考品的浓度值对其相应的吸光度值作直线回归,求得直线回归方程。将稀释后样品的吸光度值代入方程,计算出稀释后样品的浓度。

每1次人用剂量含菌数=22.86倍稀释菌液浓度 \times 22.86 \div 20。

5 结果判定

每1次人用剂量含菌数不高于 9.5×10^8 。

6 注意事项

如果测定样品吸光度值超出参考品吸光度值范围,应取3.2中菌液适当稀释后重新测定。

起草人:魏东 张园园

复核人:赵爱华

活菌数测定法

1 原理

鼠疫疫苗的活菌含量决定疫苗的效力,因此活菌数测定试验是鼠疫疫苗重要的质控指标。每批取3支疫苗,复溶后将菌液浓度稀释为含菌 1.0×10^3 /ml,接种平皿,培养后计数形成的肉眼可见的菌落形成单位(CFU),以此评价制品的活菌量。

2 材料和设备

2.1 材料 脑心或厚氏培养基等适宜平皿,脑心浸液,0.9%氯化钠溶液,中管,200 μ l、1ml、5ml移液器及吸头,“L”型涂布棒。

2.2 设备 培养箱。

3 操作方法

3.1 取3支供试品,开启后各加入0.5ml 0.9%氯化钠溶液复溶,将样品转入一中管内混匀。

3.2 取0.5ml菌液,加入稀释液7.5ml(16倍稀释)。

3.3 将16倍稀释菌液,进行如下稀释:

取16倍稀释菌液0.5ml+稀释液4.5ml (10^{-1})

取 10^{-1} 菌液0.5ml+稀释液4.5ml (10^{-2})

取 10^{-2} 菌液0.5ml+稀释液4.5ml (10^{-3})

取 10^{-3} 菌液0.5ml+稀释液4.5ml (10^{-4})

取 10^{-4} 菌液0.5ml+稀释液4.5ml (10^{-5})

取 10^{-5} 菌液0.5ml+稀释液4.5ml (10^{-6})

3.4 取 10^{-6} 菌液接种5个琼脂培养基平皿,每个平皿0.1ml,接种后立即用涂布棒涂匀,待无流动菌液后将平皿倒置于28~30 $^{\circ}$ C培养箱中培养2~3天。

4 结果计算

每 1 次人用剂量活菌数 = 5 个平皿活菌数之和 $\times 2 \times 10^6 \times 16/20$

5 结果判定

每 1 次人用剂量含活菌数应不低于 2.0×10^8 。

6 注意事项

- 6.1 在稀释过程中，每个稀释度需更换一支吸头。
- 6.2 稀释过程中与接种前应将稀释菌液充分混匀。

起草人：魏东 张园园

复核人：赵爱华

特异性毒性检查法

1 原理

具有免疫力的活疫苗需保留部分残余毒力，但如果残余毒力过强可能导致不良反应，特异性毒性检查是鼠疫疫苗重要的安全性试验。本检查取体重 250~350g 健康豚鼠 2 只，皮下注射含菌 $1.2 \times 10^{10}/\text{ml}$ 的疫苗菌液，通过注射后体重测定、病变观察以及心血和肺组织的细菌分离培养，评价疫苗的安全性。

2 材料和设备

2.1 材料 体重 250~350g 健康豚鼠（每批 2 只），0.9%氯化钠溶液，脑心琼脂或厚氏琼脂培养基等适宜平皿，1ml 移液器及吸头，1ml 注射器，剪刀，镊子，研磨器，“L”型涂布棒。

2.2 设备 培养箱。

3 操作方法

- 3.1 取 6 支供试品，启开后分别加入 0.5ml 0.9%氯化钠溶液复溶，并混合均匀。
- 3.2 取复溶菌液 2.0ml，加入 0.667ml 0.9%氯化钠溶液，稀释为含菌 $1.2 \times 10^{10}/\text{ml}$ 菌悬液备用。
- 3.3 注射：先将豚鼠标记并称重，然后将上述菌液皮下注射 2 只豚鼠，每只 1.0ml。
- 3.4 解剖观察
 - 3.4.1 注射后第 6 天称体重并取其中一只解剖，另 1 只观察到 21 天解剖。
 - 3.4.2 肉眼检查注射部位、脾、肝、肺。
 - 3.4.3 取心血 0.1ml，接种于琼脂平皿，置 $28 \sim 30^\circ\text{C}$ 培养 2~3 天后观察有无鼠疫菌生长。
 - 3.4.4 分别取脾、肝、肺组织，用研磨器研磨，接种于琼脂平皿，置 $28 \sim 30^\circ\text{C}$ 培养 2~3 天后观察有无鼠疫菌生长。

4 结果判定

注射后第 6 天称体重，体重减轻不应超过 20%，肉眼检查病变，注射部位可见充血，浸润

变为脓疡，肝和脾可有丘疹状结节，心血和肺经培养应无本菌生长，肺部不应有鼠疫特异病变为安全试验合格。肺部如有显著病变时，应用同量豚鼠复试，若仍有显著病变时，该批疫苗判不符合规定。

5 注意事项

解剖时需及时取心血接种，防止血凝后造成取材困难。

起草人：魏东 张园园

复核人：赵爱华

皮上划痕人用布氏菌活疫苗

简 述

布氏疫苗 [Brucellosis Vaccine (Live) for Percutaneous Scarification] 是由用布氏菌的弱毒菌株经培养、收集菌体加入稳定剂后冻干制成，用于预防布氏菌病。我国自 1956 年开始引进前苏联的布氏菌弱毒株 19BA 株进行生产人用布氏活疫苗，采用皮下注射接种，局部反应较大，于 1960 年改为皮上划痕接种。后经与另一株牛种布氏菌弱毒株 104M 株进行比较，结果表明 104M 株免疫原性较 19BA 株好，剩余毒力较强，适于制备皮上划痕接种用疫苗，于是使用 104M 株进行疫苗生产。

布氏疫苗检定应依据现行版《中国药典》或其他国家药品标准检测，并应符合相关要求。

布氏疫苗的检定内容按照生产阶段分为原液检定、半成品检定及成品检定。其中原液检定包括纯菌检查、浓度测定；半成品检定包括纯菌检查；成品检定项目包括鉴别试验、物理检查（外观、装量差异）、水分、纯菌检查、菌型检查、浓度测定、活菌数测定及菌落变异检查、效力测定、特异性毒性试验。特异性检测项目主要包括鉴别试验（玻片凝集法）、浓度测定、活菌数测定、菌落变异检查、特异性毒性检查。特异性检测项目的标准操作规范如下：

鉴别试验（玻片凝集法）

1 原理

在适当条件下，菌体抗原能够与特异性抗体反应，产生肉眼可见的凝集。用玻片凝集方法，对布氏疫苗进行鉴别试验分析。

2 材料和设备

2.1 抗布鲁氏菌血清标准品（牛源）（编号 230039）。

2.2 生理盐水。

2.3 载玻片，10 μ l、200 μ l、1ml 移液器及吸头。

3 操作方法

3.1 取一支供试品，启开后加入 0.5ml 0.9%氯化钠溶液复溶为凝集用菌液抗原。

3.2 取冻干标准品血清 1 支，加入 0.9%氯化钠溶液 0.5ml 复溶；取 0.1ml 复溶血清加入 0.9ml 生理盐水（10 倍稀释）。

3.3 凝集反应：在载玻片上先滴加 10 倍稀释血清 10 μ l，然后加入菌液抗原 10 μ l，用吸头混匀，5 分钟内观察凝集情况。

4 结果判定

应出现明显的凝集反应。

起草人：魏东 张园园

复核人：赵爱华

浓度测定法

1 原理

一定浓度范围内，溶液的吸光度值与其浓度呈线性关系。取代表低、中、高三个菌液浓度的浓度测定通用参考品，测定 600nm 吸光度值，以参考品的浓度值和其相应的吸光度值作直线回归，求得直线回归方程。同时测定适当稀释后待检样品的 600nm 吸光度值，带入方程求出供试品浓度。

2 材料和设备

2.1 材料 皮上划痕用鼠疫、布氏、炭疽活疫苗浓度测定通用参考品（编号 230035），0.9%氯化钠溶液，1%（ml/ml）甲醛溶液，中管，1ml 毛吸管，1ml、5ml 移液器及吸头，石英比色皿（1cm）。

2.2 设备 紫外分光光度计，培养箱。

3 操作方法

3.1 取 3 支供试品，启开后每支加入 0.5ml 0.9%氯化钠溶液，复溶后合并于中管内。

3.2 取 0.5ml 菌液加入 4.5ml 的 1%（ml/ml）甲醛 0.9%氯化钠溶液（10 倍稀释），37 $^{\circ}$ C 孵育 40 分钟。

3.3 取 1.0ml 10 倍稀释菌液加入 6.6ml 0.9%氯化钠溶液（共 76 倍稀释）。

3.4 参数设定：波长为 600nm，狭缝宽度为 2.0nm。先以 0.9%氯化钠溶液调零，然后测定炭疽活疫苗浓度测定通用参考品及 76 倍稀释菌液的 600nm 吸光度值。

4 结果计算

以参考品的浓度值对其相应的吸光度值作直线回归，求得直线回归方程。将稀释后样品的吸光度值代入方程，计算出稀释后样品的浓度。

每1次人用剂量含菌数 = 76 倍稀释菌液浓度 $\times 76 \div 20$ 。

5 结果判定

每1次人用剂量含菌数不高于 1.1×10^{10} 。

6 注意事项

如果测定样品吸光度值超出参考品吸光度值范围，应取 3.2 中菌液适当稀释后重新测定。

起草人：魏东 张圆圆

复核人：赵爱华

活菌数测定法

1 原理

布氏疫苗的活菌含量决定疫苗的效力，因此活菌数测定试验是布氏疫苗重要的质控指标。每批取 3 支疫苗，复溶后将菌液浓度稀释为含菌 $1.0 \times 10^3/\text{ml}$ ，接种平皿，培养后计数形成的肉眼可见的菌落形成单位（CFU），以此评价制品的活菌量。

2 材料和设备

2.1 材料 肝浸液琼脂或其他适宜培养基平皿，0.9%氯化钠溶液，中管，200 μl 、1ml、5ml 移液器及吸头，“L”型涂布棒。

2.2 设备 培养箱。

3 操作方法

3.1 取 3 支供试品，开启后各加入 0.5ml 0.9%氯化钠溶液复溶，将样品转入一中管内混匀。

3.2 取 0.5ml 菌液，加入 0.9%氯化钠溶液 9.0ml（19 倍稀释）。

3.3 将 19 倍稀释菌液进行如下稀释：

取 19 倍稀释菌液 0.5ml + 0.9%氯化钠溶液 4.5ml (10^{-1})

取 10^{-1} 菌液 0.5ml + 0.9%氯化钠溶液 4.5ml (10^{-2})

取 10^{-2} 菌液 0.5ml + 0.9%氯化钠溶液 4.5ml (10^{-3})

取 10^{-3} 菌液 0.5ml + 0.9%氯化钠溶液 4.5ml (10^{-4})

取 10^{-4} 菌液 0.5ml + 0.9%氯化钠溶液 4.5ml (10^{-5})

取 10^{-5} 菌液 0.5ml + 0.9%氯化钠溶液 4.5ml (10^{-6})

取 10^{-6} 菌液 0.5ml + 0.9%氯化钠溶液 4.5ml (10^{-7})

3.4 取 10^{-7} 菌液接种 5 个琼脂培养基平皿，每个平皿 0.1ml，接种后立即用涂布棒涂匀，

待无流动菌液后将平皿倒置于 35~37℃ 培养箱中培养 4~5 天。

4 结果计算

每 1 次人用剂量活菌数 = 5 个平皿活菌数之和 $\times 2 \times 10^7 \times 19/20$

5 结果判定

每 1 次人用剂量含活菌数应不低于 3.0×10^9 。

6 注意事项

- 6.1 在稀释过程中，每个稀释度需更换一支吸头。
- 6.2 稀释过程中与接种前应将稀释菌液充分混匀。

起草人：魏东 张园园

复核人：赵爱华

菌落变异检查法

1 原理

布氏菌容易发生变异，变异后细菌保护力降低，为保障疫苗保护力需控制细菌的变异率。将布氏疫苗稀释后接种平板，生长出菌落后加入结晶紫染液染色，通过肉眼观察菌落颜色变化，光滑型菌落不变色或仅边缘微呈蓝色，粗糙型菌落呈蓝紫色，计数总菌落及粗糙型菌落数量，计算变异率。

2 材料和设备

2.1 材料 胰酪大豆胨琼脂（TSA）或其他适宜培养基平皿，结晶紫储存液（2%），0.9% 氯化钠溶液，蒸馏水或注射用水，中管，200 μ l、1ml、5ml 移液器及吸头，“L”型涂布棒。

2.2 设备 培养箱。

3 操作方法

- 3.1 取 3 支供试品，开启后各加入 0.5ml 0.9% 氯化钠溶液复溶，将样品转入一中管内混匀。
- 3.2 取 0.5ml 菌液，加入 0.9% 氯化钠溶液 9.0ml（19 倍稀释）。
- 3.3 将 19 倍稀释菌液进行如下稀释：

取 19 倍稀释菌液 0.5ml + 0.9% 氯化钠溶液 4.5ml	（ 10^{-1} ）
取 10^{-1} 菌液 0.5ml + 0.9% 氯化钠溶液 4.5ml	（ 10^{-2} ）
取 10^{-2} 菌液 0.5ml + 0.9% 氯化钠溶液 4.5ml	（ 10^{-3} ）
取 10^{-3} 菌液 0.5ml + 0.9% 氯化钠溶液 4.5ml	（ 10^{-4} ）
取 10^{-4} 菌液 0.5ml + 0.9% 氯化钠溶液 4.5ml	（ 10^{-5} ）
取 10^{-5} 菌液 0.5ml + 0.9% 氯化钠溶液 4.5ml	（ 10^{-6} ）
取 10^{-6} 菌液 0.5ml + 0.9% 氯化钠溶液 4.5ml	（ 10^{-7} ）

3.4 接种：取 10^{-7} 菌液接种于 5 个琼脂培养基平皿，每个平皿 0.1ml，接种后立即用涂布棒涂匀，待无流动菌液后将平皿倒置于 $35\sim 37^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养 4~5 天。

3.5 染色及观察

3.5.1 结晶紫稀释：取结晶紫储存液（2%）用蒸馏水或注射用水进行 30 倍稀释。

3.5.2 结晶紫染色及观察：取培养后平板，每平板加入工作浓度结晶紫染液 3~5ml，覆盖菌落，染色 20 秒后吸出染液，肉眼观察结果。光滑型菌落不变色或仅边缘微呈蓝色，粗糙型菌落呈蓝紫色，计数总菌落及粗糙型菌落数量，计算变异率。

4 结果计算

$$\text{菌落变异率} = \text{粗糙型菌落数} / \text{总菌落数} \times 100\%$$

5 结果判定

菌落变异率不得超过 10%。

6 注意事项

加入及吸出结晶紫染液时操作应缓慢，避免破坏菌落形态。

起草人：魏东 张圆圆

复核人：赵爱华

特异性毒性检查法

1 原理

具有免疫力的活疫苗需保留部分残余毒力，但如果残余毒力过强可能导致不良反应，特异性毒性检查是布氏活疫苗重要的安全性试验。本实验将 18~20g 小鼠皮下注射含菌 $1.0 \times 10^9/\text{ml}$ 的菌悬液 0.5ml，通过观察动物死亡情况评价疫苗的安全性。

2 材料和设备

- 2.1 体重 18~20g 小鼠，每批 5 只。
- 2.2 0.9%氯化钠溶液。
- 2.3 1ml、5ml 移液器及吸头，1ml 注射器。

3 操作方法

- 3.1 取 3 支供试品，启开后分别加入 0.5ml 0.9%氯化钠溶液复溶，合并混匀为原液。
- 3.2 取 0.5ml 菌液，加入 0.9%氯化钠溶液 9.0ml（19 倍稀释）。
- 3.3 取 19 倍稀释菌液 0.5ml，加入 0.9%氯化钠溶液 4.5ml，为 $1.0 \times 10^9/\text{ml}$ 菌悬液。
- 3.3 将 $1.0 \times 10^9/\text{ml}$ 菌液皮下注射 5 只小鼠，每只 0.5ml。
- 3.4 注射后每天观察实验小鼠一次，观察 7 天，记录存活情况。

4 结果判定

小鼠不应有死亡，如有死亡应复试一次，仍有死亡，为不合格。

起草人：魏东 张园园

复核人：赵爱华

皮上划痕人用炭疽活疫苗

简 述

炭疽疫苗 [Anthrax Vaccine (Live) for Percutaneous Scarification] 是由炭疽芽孢杆菌弱毒株 A16R 株生产的活芽孢疫苗，专供人体皮上划痕接种使用，以预防人炭疽病。1958 年将炭疽病死动物（驴）分离的 A16 菌株经紫外线照射诱变，选育得到无荚膜水肿型弱毒菌 A16R 株。经检测证明此菌株能分解动物蛋白，免疫原性较好，残余毒力弱。经全面鉴定后，于 1962 年正式批准生产人用炭疽 A16R 株活芽孢疫苗，用于人体皮肤划痕接种。

炭疽疫苗检定应依据现行版《中国药典》或其他国家药品标准检测，并应符合相关要求。

炭疽疫苗的检定内容按照生产阶段分为原液检定、半成品检定及成品检定。其中原液检定包括纯菌检查、浓度测定；半成品检定为纯菌检查；成品检定项目包括鉴别试验、物理检查（外观、装量）、纯菌检查、浓度测定、活菌数测定、效力测定、特异性毒性检查。特异性检测项目主要包括鉴别试验、纯菌检查（噬菌体裂解试验）、浓度测定、活菌数测定、特异性毒性检查。特异性检测项目的标准操作规范如下。

鉴别试验

1 原理

噬菌体具有溶菌作用和严格的种型特异性，能够对宿主菌产生特异性裂解。利用噬菌体裂解特性，对炭疽疫苗进行鉴别试验分析。

2 材料和设备

2.1 材料 炭疽噬菌体国家参考品（编号 230032），0.9%氯化钠溶液，脑心琼脂或厚氏琼脂培养基等适宜平皿，1ml 移液器及吸头，接种环。

2.2 设备 培养箱。

3 操作方法

取1支供试品,启开后用接种环取菌液涂于琼脂培养基上,滴1滴炭疽噬菌体,然后将平皿倾斜,使噬菌体在培养基上流过,置33~34℃培养24小时。

4 结果判定

噬菌体流过处无本菌生长。

5 注意事项

噬菌体裂解带应宽于噬菌体流经宽度。

起草人:魏东 张园园

复核人:赵爱华

纯菌检查法(噬菌体裂解试验)

1 原理

现行版《中国药典》中炭疽疫苗纯菌检查试验包括两个方法:直接接种方法和噬菌体裂解方法。其中噬菌体裂解方法为2015年版《中国药典》新增加的方法。由于活疫苗制剂中高浓度的活菌对可能存在的污染菌具有抑制作用,直接接种方法对活疫苗中少量的污染菌存在漏检可能。利用噬菌体特异性裂解作用,将噬菌体与活疫苗混合后进行接种培养,由于疫苗本菌被噬菌体裂解,如有污染菌落易被发现。

2 材料和设备

2.1 材料 炭疽噬菌体国家参考品(编号230032),0.9%氯化钠溶液,营养琼脂培养基平皿,200 μ l移液器及吸头,1.5ml离心管,“L”型涂布棒,封口膜,革兰染液。

2.2 设备 培养箱。

3 操作方法

开启1支供试品,取120 μ l菌液与120 μ l噬菌体在1.5ml离心管中混合,接种于2个营养琼脂培养基平皿,每个平皿接种100 μ l,用涂布棒涂匀,分别置20~25℃、30~35℃培养16~24小时后观察结果。同时取菌液作阳性对照,取0.9%氯化钠溶液作阴性对照。

4 结果判定

应无杂菌生长。

如有细菌生长,应与阳性对照菌同时进行革兰染色镜检,若经确认为本菌,判供试品符合规定。

如阳性对照平皿无细菌生长或阴性对照平皿有菌生长,则试验无效,应取同量供试品重试。

5 注意事项

每批样品需更换移液器吸头及涂布棒。

起草人：魏东 张园园

复核人：赵爱华

浓度测定法

1 原理

一定浓度范围内，溶液的吸光度值与其浓度呈线性关系。取代表低、中、高三个菌液浓度的浓度测定通用参考品，测定 600nm 吸光度值，以参考品的浓度值和其相应的吸光度值作直线回归，求得直线回归方程。同时测定适当稀释后待检样品的 600nm 吸光度值，带入方程求出供试品浓度。

2 材料和设备

2.1 材料 皮上划痕用鼠疫、布氏、炭疽活疫苗浓度测定通用参考品(编号 230035)，0.9% 氯化钠溶液，1% (ml/ml) 甲醛溶液，中管，1ml 毛吸管，1ml、5ml 移液器及吸头，石英比色皿 (1cm)。

2.2 设备 紫外分光光度计，培养箱。

3 操作方法

3.1 取 3 支供试品，开启后将菌液合并至一中管内，混合均匀。

3.2 取 0.5ml 菌液加入 4.5ml 1% (ml/ml) 甲醛的 0.9% 氯化钠溶液 (10 倍稀释)，37℃ 孵育 2 小时。

3.3 取 1.0ml 10 倍稀释菌液加入 7.0ml 0.9% 氯化钠溶液 (共 80 倍稀释)。

3.4 参数设定：波长为 600nm，狭缝宽度为 2.0nm。先以 0.9% 氯化钠溶液调零，然后测定浓度测定通用参考品及 80 倍稀释菌液的 600nm 吸光度值。

4 结果计算

以参考品的浓度值对其相应的吸光度值作直线回归，求得直线回归方程。将稀释后样品的吸光度值代入方程，计算出稀释后样品的浓度，该结果乘以 80 为每 1ml 菌液的含菌量。

5 结果判定

每 1ml 含菌 $3.2 \times 10^9 \sim 4.8 \times 10^9$ 。

6 注意事项

如果测定样品吸光度值超出参考品吸光度值范围，应取 3.2 中菌液适当稀释后重新测定。

起草人：魏东 张园园

复核人：赵爱华

活菌数测定法

1 原理

炭疽疫苗的活菌含量决定疫苗的效力，因此活菌数测定试验是炭疽疫苗重要的质控指标。每批取 3 支疫苗，混匀并稀释为含菌 $5.0 \times 10^2/\text{ml}$ ，接种平皿，培养后计数形成的肉眼可见的菌落形成单位（CFU），以此评价制品的活菌量。

2 材料和设备

2.1 材料 脑心或厚氏培养基等适宜平皿，注射用水，中管，200 μl 、1ml、5ml 移液器及吸头，“L”型涂布棒。

2.2 设备 培养箱。

3 操作方法

3.1 取 3 支供试品，开启后将 3 个样品吸入 中管内混匀。

3.2 取 0.5ml 菌液，加入注射用水 3.5ml（8 倍稀释），混匀。

3.3 将 8 倍稀释菌液，进行如下稀释：

取 8 倍稀释菌液 0.5ml + 注射用水 4.5ml (10^{-1})

取 10^{-1} 菌液 0.5ml + 注射用水 4.5ml (10^{-2})

取 10^{-2} 菌液 0.5ml + 注射用水 4.5ml (10^{-3})

取 10^{-3} 菌液 0.5ml + 注射用水 4.5ml (10^{-4})

取 10^{-4} 菌液 0.5ml + 注射用水 4.5ml (10^{-5})

取 10^{-5} 菌液 0.5ml + 注射用水 4.5ml (10^{-6})

3.4 取 10^{-6} 菌液接种 5 个琼脂培养基平皿，每个平皿 0.1ml，种后立即用涂布棒涂匀，待无流动菌液后将平皿倒置于 $35 \sim 37^\circ\text{C}$ 培养箱中培养 24 小时。

4 结果计算

每 1 次人用剂量活菌数 = 5 个平皿活菌数之和 $\times 2 \times 10^6 \times 8/20$

5 结果判定

每 1 次人用剂量含活菌数应不低于 8.0×10^7 。

6 注意事项

6.1 在稀释过程中，每个稀释度需更换一支吸头。

6.2 稀释过程中与接种前应将稀释液充分混匀。

起草人：魏东 张园园

复核人：赵爱华

特异性毒性检查法

1 原理

具有免疫力的活疫苗需保留部分残余毒力，但如果残余毒力过强可能导致不良反应，特异性毒性检查是炭疽疫苗重要的安全性试验。本检查将体重 2.0~2.5kg 健康家兔皮下注射含菌 $2.5 \times 10^8/\text{ml}$ 菌悬液 1ml，通过观察注射部位水肿及动物存活情况评价疫苗的安全性。

2 材料和设备

- 2.1 体重 2.0~2.5kg 健康家兔，每批 5 只。
- 2.2 注射用水。
- 2.3 200 μl 、1ml 移液器及吸头，2ml 注射器，试管。

3 操作方法

- 3.1 取 3 支供试品，开启后将 3 个样品吸入一中管内混匀。
- 3.2 取 0.5ml 菌液，加入注射用水 7.5ml，为 $2.5 \times 10^8/\text{ml}$ 菌悬液。
- 3.3 将上述菌液皮下注射 5 只家兔，每只 1ml。
- 3.4 观察注射部位水肿及动物存活情况，观察 10 天。

4 结果判定

注射部位可有水肿，动物应全部存活，如有死亡，加倍动物复试，如仍有死亡，判为不合格。

起草人：魏东 张园园
复核人：赵爱华

钩端螺旋体疫苗

简 述

钩端螺旋体病（简称钩体病）是由致病性钩端螺旋体（简称钩体）引起的一种急性人兽共患传染病。疫苗是预防传染病最有效也是最经济的手段。人类使用钩体疫苗已有半个多世纪的历史，预防接种该疫苗在控制钩体病方面发挥了重要的作用。中国作为为数不多仍保留人用钩体疫苗的国家，在当前免疫规划程序中使用的钩体疫苗系用各地区主要的钩端螺旋体流行菌

型，推荐的疫苗接种对象为钩体流行地区 7~60 岁的人群。共注射 2 针，间隔 7~10 天，第 1 针注射 0.5ml，第 2 针注射 1.0ml。

疫苗的质量控制是为了保证生产疫苗产品安全、有效。因此产品的相关质量控制应该是贯穿在整个疫苗的生产过程中，由于所用生产培养基的不同，生产工艺的不同以及接种对象的不同，各国钩体疫苗的质控项目及其标准有所不同，应以本国质量标准要求执行。

目前，我们钩体疫苗生产和检定的质量标准（《中国药典》2015 年版三部）主要包括疫苗生产用培养基、种子培养物、接种与培养、原液处理、半成品和成品，要求均需按质量标准进行相应质量控制与检定。在各项检测中，安全试验和效力试验是最重要的，尤其是效力试验。在我国钩体疫苗标准中既规定了对强毒株生产的疫苗要进行效力检定（强毒株法），对弱毒株生产的疫苗也要进行效力检定（弱毒株法）。目前中国钩体疫苗生产的培养基是全综合培养基，生产工艺简单，未添加特殊的物质，故在疫苗的安全性检查方面，要求检测无菌试验和异常毒性试验。

鉴别试验（试管凝集法）

1 原理

试管凝集法检测原理是用一系列倍比稀释的参考血清与适量的供试颗粒性疫苗悬液在试管中进行的凝集反应，根据试验结果判定供试疫苗悬液中有无相应特异性疫苗抗原成分。

2 材料和设备

- 2.1 材料 不同血清群钩端螺旋体特异性参考血清，0.9%氯化钠溶液。
- 2.2 设备 37℃培养孵箱。

3 操作方法

3.1 免疫血清的稀释 取疫苗所含菌型相应的冻干免疫血清标准品各一支，加 0.5ml 0.9%氯化钠溶液复溶，用 0.9%氯化钠溶液按 1:50 倍开始进行倍比稀释待用。然后取疫苗所含菌型相应的复溶免疫血清 20 μ l 加入试管中，加入 0.9%氯化钠溶液 1ml（1:50 倍稀释），从前一管管中取 0.5ml，倍比稀释至 1:400。

3.2 试管凝集 根据供试疫苗的抗原型别，取若干试管，排列一排，标明疫苗批号及抗原型别。并在每个试管中分别加入相应的已稀释的免疫血清各 0.5ml；在上述每个试管中分别加入相应的钩端螺旋体疫苗各 0.5ml。振摇 1 分钟，放入 37℃孵箱中过夜。

4 结果判定

从孵箱中取出，室温静置 30 分钟，在灯光下观察试管底部是否有沉淀物。++++：试管底部有很大凝集块，溶液完全澄清；+++：试管底部有很大凝集块，溶液不完全澄清；++：试管底部有较大凝集块，溶液呈混浊，轻摇试管有明显的颗粒（或絮状物）；+：试管底部有部分凝集块，轻摇试管有可见的颗粒（或絮状物）；±：试管底部有少许凝集块，轻摇试管颗粒不显著；-：试管底部菌体聚集成一点，溶液呈均匀混浊，与对照相同。终点滴度以 + 为判定标准。

5 注意事项

- 5.1 疫苗抗原与血清抗体两种液体混合时,需用吸管连续吸取数次,务必使抗原抗体充分混匀。
- 5.2 判断结果时,应在暗背景下透过强光逐管检查。

起草人:徐颖华

复核人:辛晓芳 叶强

效力检查法

1 原理

将疫苗免疫动物后,使动物机体自身产生对特定病原微生物特异性免疫保护力,可预防疾病的发生;应用毒株攻击,可保护免疫动物免受感染或死亡,在疫苗质控中,常作为一种量化质控试验,用于去判别疫苗是否有效。

2 材料和设备

- 2.1 材料 兔血清,钩端螺旋体培养基,具有实验动物等级合格证的 120~220g 豚鼠。
- 2.2 设备 生物安全柜,暗视野显微镜。

3 操作方法

- 3.1 按供试品疫苗所含菌型价数检定,用 0.9%氯化钠溶液将疫苗稀释成每型含菌数 5×10^7 条/ml。
- 3.2 每组免疫体重 120~220g 豚鼠 3 只(对照组 3 只应同时饲养),皮下免疫 2 次,第 1 次 0.5ml,第 2 次 1ml,间隔 5 天。
- 3.3 末次免疫注射后 10~12 天,用同株或同型异株培养 5~10 天、每视野 50~100 条/400× 的培养物 2ml 进行皮下攻击。

4 结果判定

- 4.1 强毒株 攻击后观察 10 天,免疫组豚鼠应健存,外观及食欲正常,不耸毛,运动活泼,体重增加,解剖无黄疸。对照组豚鼠至少应有 2 只患钩端螺旋体病死亡,判为合格。
- 4.2 弱毒株 攻击后 24 小时抽取心血,分别接种 2 管含 8%~10%健康兔血清钩端螺旋体培养基,每管 1~2 滴(约为 1%接种量),培养 14 天。免疫组心血培养 2/3 以上为阴性,对照组均为阳性,判为合格。

5 注意事项

钩端螺旋体培养时应该每天观察生长情况,确保生长期对数期的(视不同菌株生长情况一般需要培养 5~10 天)钩端螺旋体用于皮下攻击试验。

起草人:徐颖华

复核人:辛晓芳 叶强

菌种多序列位点基因型检查法

1 原理

多序列位点基因型分析方法 (MLST) 是一种基于核酸序列测定的细菌分型方法, 通过 PCR 扩增多个管家基因内部片段, 测定其序列, 分析菌株的变异, 具有一定特异性, 从而进行分型。

2 材料和设备

2.1 材料 兔血清, 钩端螺旋体培养基, 细菌 DNA 提取试剂盒, Ex Taq DNA 聚合酶, DNA marker DL1000。

2.2 设备 PCR 仪, 电泳仪。

3 操作方法

3.1 细菌培养及 DNA 提取 将钩体疫苗株分别接种至含 10% 兔血清钩端螺旋体培养基中, 28℃ 培养 10~14 天; 收集菌体, 按商业化 DNA 试剂盒操作步骤提取基因组总 DNA, 放置 -20℃ 保存。

3.2 MLST 分析 以钩体疫苗株 DNA 为模板, 应用 7 种管家基因引物进行 PCR 扩增 (引物序列见表 1)。PCR 反应条件为: 95℃ 预变性 2 分钟; 95℃ 10 秒, 46℃ 15 秒, 72℃ 30 秒, 共 30 个循环; 72℃ 再延伸 10 分钟。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳筛选出阳性产物, 送公司测序。

表 1 扩增引物序列及靶基因序列长度

基因位点	基因序列 (5'→3')	扩增产物大小 (bp)
glmU	FM: AGGATAAGGTCGCTGTGGTA	650
	RM: AGTTTTTTTCCGGAGTTTCT	
pntA	FM: TAGGAAAGATGAAACCRGGAAC	621
	RM: AAGAAGCAAGATCCACAACACTAC	
sucA	FM: TCATTCCAATTCTAGATACGAT	640
	RM: TCTTTTTTGAATTTTTTGACG	
tpiA	FM: TTGCAGGAAACTGGAAAATGAAT	639
	RM: GTTTTACGGAACCACCGTAGAGAAT	
pfkB	FM: CGGAGAGTTTTATAAGAAGGACAT	588
	RM: AGAACACCCGCCGCAAAAACAAT	
mreA	FM: GGCTCGCTCTCGACGGAAA	719
	RM: TCCATAACTCATAAACGACAAAGG	
caiB	FM: CAACTTGCGGACATAGGAGGAG	650
	RM: ATTATGTTCCCCGTGACTCG	

4 结果计算

将钩体 7 个管家基因序列结果与 *Leptospira* spp. MLST Databases 网站 (https://pubmlst.org/bigssdb?db=pubmlst_leptospira_seqdef&page=sequenceQuery) 上相应的管家基因进行比对, 获得等位基因编号, 所有等位基因的编号组成菌株最终基因序列型。

5 结果判定

根据上述结果计算, 获得每株钩体疫苗菌种 MLST 分析结果, 应符合拟定 MLST 分析质量标准 (表 2)。

表 2 中国钩体疫苗株拟定 MLST 基因型分析质量标准

菌株	glnI	putA	sucA	tpiA	pfkfb	mrcA	caiB	基因型
罗株	3	3	3	3	4	5	16	140
广 229 株	3	2	3	3	4	5	5	36
沃 34 株	1	2	3	5	6	1	7	107
临 4 株	1	12	3	3	4	6	5	95
赖株	1	1	1	1	1	1	1	1
临 6 株	3	1	2	3	6	6	6	92
611 株	3	3	3	3	4	5	5	37

6 注意事项

6.1 确保商业化 DNA 提取试剂盒的有效性, 并严格按照说明书推荐方法进行 DNA 提取。

6.2 加样过程应该严格控制, 防止污染; 建议设立 PCR 配液与模板加样的专用移液器, 并且将 PCR 反应液配制和 DNA 模板上样试验区域进行有效的物理隔离, 以减少污染机会。

起草人: 徐颖华

复核人: 辛晓芳 叶强

流感病毒裂解疫苗

简 述

流行性感冒简称流感，是由流感病毒（influenza virus）引起的急性呼吸道传染病。据世界卫生组织（WHO）推算，全球每年有5%~15%的人口感染流感病毒，并导致300万~500万的住院病例和29万~65万的死亡病例。

流感病毒属于正粘病毒科，基因组由多节段单负链RNA构成。根据核蛋白（nucleoprotein, NP）和基质蛋白（matrix, M）的不同可以分为甲（A）、乙（B）、丙（C）三型。其中甲型流感病毒可造成世界范围内大流行流感，比如2009年的甲型H1N1流感，乙型流感病毒多引起地区局部流行。病毒表面有血凝素（hemagglutinin, HA）与神经氨酸酶（neuraminidase, NA）两种糖蛋白。根据HA与NA的不同，甲型流感病毒又可以分为不同亚型。HA能够结合宿主细胞表面的唾液酸受体，使病毒进入细胞，并介导病毒与细胞膜的融合，针对HA的抗体能够中和病毒，阻止病毒的感染。NA是一种糖苷外切酶，能够切断HA与宿主细胞的连接，使新组装的病毒得到释放，该蛋白也是流感治疗药物的主要靶位。目前发现甲型流感病毒HA有18个亚型，NA有11个亚型。

预防流感最有效的手段为疫苗接种。由于流感病毒变异速度快，WHO设立全球流感疫情监控网络实验室，监测流感病毒的流行情况，并推荐流感疫苗生产毒株。流感疫苗有全病毒疫苗、裂解疫苗、亚单位疫苗、重组疫苗与冷适应减毒活疫苗等不同类型。目前全球应用最广泛的为三价流感病毒裂解疫苗，包含H1N1、H3N2两株甲型病毒和一株乙型病毒。包含两株乙型病毒的四价裂解疫苗和三价流感病毒亚单位疫苗也已在我国上市使用。

疫苗成品检验项目包括鉴别、外观、装量、渗透压摩尔浓度、pH值、游离甲醛含量、血凝素含量、蛋白质含量、卵清蛋白含量、无菌检查、异常毒性检查以及细菌内毒素含量检查。其中鉴别实验、血凝素含量和卵清蛋白含量实验为流感病毒裂解疫苗特异性检测项目。

鉴别试验和血凝素含量测定法

1 原理

流感病毒裂解疫苗的主要有效成分为血凝素，这也是疫苗效力的唯一指标。鉴别试验和血凝素含量检测均采用单向免疫扩散的方法。将毒株特异的血凝素抗血清加入琼脂糖凝胶中，以琼脂糖凝胶为介质，对应的血凝素抗原能与其抗血清发生特异性反应，形成肉眼可见的沉淀环，非对应血凝素则不形成沉淀环。并且，在一定的范围内沉淀环的直径与抗原含量成正比。将标准抗原沉淀环的直径与抗原浓度进行直线回归，求出直线回归方程，代入供试品沉淀环直径，即可得到供试品的血凝素含量。

2 材料和设备

2.1 材料 与疫苗生产毒株对应型别抗原标准品和抗血清, 磷酸盐缓冲液 (PBS), 琼脂糖, 两性去污剂 Zwittergent 3-14, 考马斯亮蓝 G250, 甲醇, 冰醋酸, 去离子水, 烧杯, 塑料凝胶板 (GELBOND), 打孔器, 滤纸, 湿盒, 打孔器 (外径 3~4mm)。

2.2 设备 水平台, 可调量程移液器, 微波炉, 水浴锅, 生化培养箱, 干燥箱, 游标卡尺或扫描仪。

2.3 溶液配制 以下所有溶液配制过程可以按照所需体积按比例进行配制。

2.3.1 1.5%琼脂糖: 称取 1.5g 琼脂糖加入 100ml PBS 溶液中。使用微波炉加热至沸腾, 停止加热后摇匀, 重复此步骤至琼脂糖完全溶解, 无可见颗粒。按照所需体积分装至小烧杯中, 放置于 $56^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中备用, 只能当天使用。

2.3.2 10%裂解剂: 称取 1g 两性去污剂 Zwittergent 3-14, 使用 10ml 去离子水溶解后室温保存。

2.3.3 染色液: 称取 5g 考马斯亮蓝 G250, 使用 450ml 甲醇溶解后加入 100ml 冰醋酸, 加去离子水至 1L, 室温保存。

2.3.4 脱色液: 量取 100ml 冰醋酸, 450ml 甲醇, 加去离子水至 1L, 室温保存。

3 操作方法

3.1 琼脂板制备与打孔 将塑料凝胶板 (GELBOND) 裁剪至 $10\text{cm} \times 10\text{cm}$ 大小 (也可根据需要裁剪为其他尺寸, 琼脂糖凝胶体积则应按面积进行调整), 疏水面使用记号笔进行标记, 亲水面朝上, 下垫玻璃板, 放置于水平台上。将适宜体积的标准抗血清加入至 25ml 56°C 的 1.5% 琼脂糖溶液中, 手动摇匀, 摇匀过程应轻柔, 避免产生大量气泡。将琼脂糖倒在凝胶板上, 如有气泡应使用移液器迅速吸除。静置至琼脂糖完全凝固后, 放入 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 冰箱冷藏至少 15 分钟。取出冷藏后的琼脂板使用打孔器进行打孔, 孔间约 1.5cm, $10\text{cm} \times 10\text{cm}$ 大小的琼脂板可打 36 孔。使用真空泵将孔内凝胶小心吸出。琼脂板只能当天使用。

3.2 抗原标准品溶液制备 按照抗原标准品中血凝素含量, 加入一定体积的去离子水进行复溶, 使溶解后的标准品血凝素浓度为 $40\mu\text{g}/\text{ml}$ 。复溶后的标准品应室温静置至少 5 分钟以完全溶解。

3.3 抗原标准品和供试品裂解和稀释 取 $450\mu\text{l}$ 抗原标准品溶液与 $50\mu\text{l}$ 10%裂解剂混匀后室温放置 30 分钟进行裂解, 相同方法进行供试品裂解。裂解后的抗原标准品溶液使用 PBS 分别进行 3/4, 1/2, 1/4 倍稀释。

3.4 上样与扩散 使用可调量程移液器分别将标准品和供试品加入琼脂板孔中, 3mm 打孔器可加入 $10\mu\text{l}/\text{孔}$, 4mm 打孔器可加入 $20\mu\text{l}/\text{孔}$ 。待孔内液体完全吸收后, 将凝胶板放置于湿盒中, $20\sim 25^{\circ}\text{C}$ 静置扩散 18~24 小时。

3.5 洗胶 将琼脂板取出后, 在 PBS 溶液中浸泡 1 小时以去除凝胶内的血清。

3.6 压胶 琼脂板放置在玻璃板上, 上面铺上 10~15 层滤纸, 如有多块琼脂板可以玻璃板分隔后继续铺在上面, 最后上面压一块约 2kg 大理石板或不锈钢板, 压约 1 小时至琼脂板变为薄薄一层。

3.7 烘干 将压薄的琼脂板放入约 50°C 干燥箱至完全干燥。

3.8 染色脱色 使用染色液染色约 5 分钟至琼脂板变为蓝色,取出后先使用去离子水漂洗去除表面染色液,使用脱色液进行脱色至沉淀环清晰,背景变为浅蓝或透明。使用去离子水进行漂洗后再次烘干或者室温晾干。

3.9 沉淀环直径测量 使用扫描仪扫描图片后使用 Immulab 软件进行自动测量,或使用 PhotoShop 软件进行手工测量,或直接使用游标卡尺进行手工测量。

4 鉴别实验结果判定

用相应(亚)型流感病毒特异性免疫血清进行单向免疫扩散试验,结果应证明抗原性与推荐病毒株相一致。

5 血凝素含量结果计算

以流感病毒血凝素标准抗原形成的沉淀环直径对其相应的抗原浓度求一直线回归方程。将供试品所形成的沉淀环直径,代入直线回归方程,即可得到供试品血凝素含量。

6 注意事项

6.1 标准抗血清首次使用时应进行浓度确定,可按照说明书推荐的浓度范围选取数个浓度进行单向免疫扩散实验,选取沉淀环清晰,标准曲线 R^2 值高的浓度作为使用浓度。

6.2 如果长时间脱色后背景仍很深,表明琼脂板内残留抗血清浓度过高,可在步骤 3.6 压胶完成后再次进行步骤 3.5 洗胶。

6.3 也可使用玻璃板代替塑料凝胶板,则以下步骤需进行调整:步骤 3.6 压胶时将琼脂糖板从玻璃板上取下,加入两张滤纸中间;步骤 3.7 烘干时将琼脂糖板铺在一张滤纸上烘干;步骤 3.8 脱色后不进行烘干,以防止凝胶变形。

起草人:徐康维

复核人:李长贵

卵清蛋白含量测定法

1 原理

本试验采用酶联免疫法(双抗体夹心)将抗卵清蛋白抗体包被到微孔板中,加入酶标抗体和供试品后孵育,洗去未结合部分,加入 TMB 显色,以卵清蛋白标准溶液的吸光度值与其对应浓度做直线回归,计算供试品的卵清蛋白含量。

2 材料和设备

2.1 材料 酶标试剂盒 Serazym Ovalbumin ELISA。

2.2 设备 酶标仪、水浴箱。

3 操作方法

将酶标试剂盒、供试品和纯化水平衡至室温。将洗涤液用纯化水配制成 1:10 的工作洗液。

3.1 标准品和供试品上样

3.1.1 将酶标抗体溶液加入 96 孔板各孔，100 μ l/孔。

3.1.2 将试剂盒中各标准卵清蛋白溶液分别加入 96 孔板。用稀释液将供试品稀释至适宜浓度，加入 96 孔板。标准品和供试品均加入 100 μ l/孔，每个浓度两孔，混匀。

3.2 孵育洗板 用带胶膜纸将板封好，37 $^{\circ}$ C 孵育 60 分钟。之后取出已孵育完毕的反应板，弃去带胶膜纸，用洗液进行洗板 5 次后拍干。

3.3 显色读值 加入 TMB 显色剂 100 μ l/孔，37 $^{\circ}$ C 避光孵育 10 分钟后，加入终止液 100 μ l/孔，终止反应。

使用酶标仪在 450nm/620nm 波长下测定吸光度。

4 结果计算

以卵清蛋白标准品溶液的吸光度值与其对应浓度做直线回归。将供试品吸光度值代入标准曲线求出对应的浓度，乘以稀释倍数后即为供试品卵清蛋白浓度。

5 结果判定

成品中卵清蛋白含量应不高于 500ng/ml。

试验有效性要求如下。

标准浓度吸光度值	S1	20ng/ml	≥ 1.50 ng/ml
标准浓度吸光度值	S7	0.3125ng/ml	≤ 0.50 ng/ml
质控		7.5ng/ml	5 ~ 10ng/ml

起草人：徐康维

复核人：李长贵

血凝滴度测定法

1 原理

流感病毒的血凝素能够识别并结合宿主细胞表面的唾液酸受体，该类受体广泛存在于哺乳动物和鸟类红细胞表面，因此这些红细胞能够被流感病毒凝集，简称为血凝。流感病毒血凝滴度检测通常以鸡血红细胞进行检测。

2 材料

1%鸡血红细胞悬液，0.9%氯化钠溶液，微量血凝板（U 型）。

3 操作方法

3.1 流感病毒供试品稀释 血凝板的第各孔加入 0.9%氯化钠溶液 25 μ l，第 1 孔加入被检病毒液 25 μ l，用移液器反复吹吸混匀，吸出 25 μ l 移至第 2 孔，以此类推，等体积倍比稀释直至第 12 孔，从第 12 孔中吸出 25 μ l 弃去。以此方法对病毒稀释，血凝板第 1 孔病毒稀释度为 1:2，第 2 孔为 1:4，第 3 孔为 1:8，以此类推。另设 2 孔，每孔加入 25 μ l 0.9%氯化钠溶液为阴性对照。

3.2 血凝检测 每孔中加入 1% 鸡红细胞悬液 25 μ l，混匀后室温静置 30 分钟，观察并记录红细胞凝集结果。

4 结果计算

血凝判定阴性对照孔应呈现完全不凝集 (-)，否则此次检验无效。

按表 1 标准判读结果。以血凝出现 “++” 病毒最高稀释度为该病毒的血凝效价。

表 1 红细胞凝集结果

类别	孔底描述	效价
1	红细胞全部凝集，均匀铺于孔底，即 100% 红细胞凝集	++++
2	红细胞凝集基本同上，但孔底有大圈	+++
3	红细胞于孔底形成中等大的圈，四周有小凝块	++
4	红细胞于孔底形成小圆点，四周有少许凝集块	+
5	红细胞于孔底呈小圆点，边缘光滑整齐，即红细胞完全不凝集。将血凝板倾斜 60° 并放置 30 秒，红细胞呈泪滴状	-

起草人：徐康维

复核人：李长贵

麻腮风疫苗及联合减毒活疫苗

简 述

麻疹是一种经呼吸道传播的传染性极强的病毒性疾病，其主要临床症状包括发热、呼吸道卡他、皮疹、柯氏斑等。临床初期可表现为一般的上呼吸道感染症状，随后常见高热。大部分麻疹患者经过典型或非典型发热皮疹上呼吸道感染症状后可由于病毒自限恢复健康，并获得天然免疫力。但少部分可进展发生中耳炎、肺炎、腹泻、感染后脑炎、亚急性进化性全脑炎 (SSPE)，甚至死亡。自 2003 年 WHO 建立了全球麻疹监测体系后，陆续在世界范围内标准化病例确诊与病毒鉴定的程序，逐步摸索出了麻疹不同基因型在全球范围内的分布。虽然存在不同的基因型但只有一个血清型，因此接种疫苗的免疫效果可覆盖不同基因型的野毒株。目前欧美在售的 MMR 相关疫苗麻疹毒株主要为 Schwarz 株与 Moraten 株，均为 Edmonston 衍生株。我国目前在售的 MMR 相关疫苗麻疹毒株主要为沪 191，是 1960 年由上海生物制品研究所自典型麻疹患儿分离获得病毒，经原代人胚肾细胞、原代人

羊膜细胞、鸡胚细胞传代减毒成功后,1966年经国家检定合格后批准使用的。

腮腺炎与麻疹同属于副粘病毒科,是经呼吸道传播的传染性极强的病毒性疾病。目前世界范围应用最广泛的腮腺炎疫苗株为 Jeryl Lynn 株,1967 年在美国批准使用,GSK 公司的 RIT 4385 株是来源于 Jeryl Lynn 株的 JL-1 株克隆。除此之外还有日本分离获得的 Urabe 株和俄罗斯分离获得的 Leningrad 株。已证明多数腮腺炎疫苗株均包含两种不同的病毒株。目前各生产企业采用的生产基质包括 CEF 鸡胚成纤维细胞、CWE 完整鸡胚、JQE 日本鹌鹑胚等。我国目前在售的腮腺炎疫苗或含有腮腺炎成分的联合疫苗为 S79 株,上海生物制品研究所于 1979 年由美国获得的 Jeryl Lynn 株经原代鸡胚细胞传至第二代,全面检定合格后建立了 S79 株,1984 年经国家批准用于腮腺炎疫苗的生产。

风疹病毒是正链 RNA 病毒,由 9762 个氨基酸构成,属于披膜病毒科风疹病毒属。最早的风疹疫苗是欧美国家 1969~1970 年批准的 HPV-77 (鸭胚)、HPV-77 (狗肾)与 Cendehill (兔肾)与 RA27/3 (人二倍体细胞)。1979 年随着 RA27/3 (人二倍体细胞)被用于 MMR II 疫苗在美国的批准上市,之前用于 MMR I 疫苗中的 HPV-77 疫苗株逐渐被替代,日本主要使用自主建立的 TO-336 (兔肾),Matsuba (兔肾),Matsuura (鹌鹑胚胎成纤维细胞)和 Takahashi (兔肾)。目前世界范围内主要应用的毒株为 RA27/3。我国的风疹疫苗株是 1979 年北京生物制品研究所从一风疹患儿分离病毒并经人二倍体细胞 2BS 株连续传代减毒后获得的,该毒株于 1993 年获试生产文号,1998 年获得正式生产文号。由于风疹病毒可适应多种细胞培养,包括哺乳动物的原代细胞、传代细胞,如非洲绿猴肾、牛胚肾、兔肾、人胚肾以及多种人二倍体细胞等,各生产企业根据自己研发的体系选择相应的生产基质,欧美企业多选用人二倍体细胞如 MRC-5、WI-38,日本企业多采用兔肾细胞,我国企业目前的生产细胞基质主要采用人二倍体细胞 MRC-5 与 2BS。《中国药典》2015 年版根据国内风疹疫苗注册生产情况删减了风疹减毒活疫苗(兔肾细胞)相关章节,仅保留了风疹减毒活疫苗(人二倍体细胞)的规定。

麻腮风效力试验病毒滴度中要求同时滴定麻疹、腮腺炎、风疹病毒参考品,2007 年我国选用相应病毒株生产并制备了我国麻疹、腮腺炎、风疹病毒国家参考品,生产过程中严格控制了精密性、水分含量,并对候选参考苗进行了鉴别试验、水分含量、病毒滴度及无菌检查,并同时比对了 NIBSC 的麻疹、腮腺炎、风疹国际参考品(92/648,90/534,91/688)。通过 5 个实验室的协作标定,不仅对实验室内变异、实验室间变异与国际参考品在不同实验室间的变异进行了分析,并且获得了候选苗的热稳定性和实时稳定性结果,证明了我国制备的国家参考品具备良好的稳定性与支间一致性。麻疹与风疹为 2009 年获批使用,腮腺炎为 2014 年获批,批准文号分别为麻疹减毒活疫苗国家参考品 310013-200701,腮腺炎减毒活疫苗参考品 20070401,风疹减毒活疫苗参考品 310014-200701,滴度分别为 (4.96 ± 0.26) CCID₅₀/ml, (4.96 ± 0.38) CCID₅₀/ml, (4.56 ± 0.52) CCID₅₀/ml,参考品在過去的应用中一直保持着稳定的效价沿用至今。

我国的麻腮风分别于 1966 年、1984 年、1998 年上市单价疫苗,2000 年上市麻腮二联,2002 年上市麻风二联、麻腮风三联,目前有多家企业获批生产麻疹、腮腺炎、风疹单价以及相关联合疫苗。目前我国的免疫计划是 8 月龄初免麻疹单苗或麻风二联,18 月龄时采用 MMR 三联苗加强,国产疫苗配方中含有明胶、人血白蛋白等保护剂。

疫苗生产过程中的质控关键点主要为毒株、细胞基质、原辅料、关键操作参数、检定

等几方面。过程控制主要为全过程质量控制、批间一致性控制以及成分控制。通过对半成品配制点有效性参数进行测定，综合误差确定配制点；对关键步骤中间产物的关键参数进行测定，制定批间一致性范围；对成品、疫苗原液采取多个关键指标综合控制批间一致性。对疫苗有效成分，相关杂质包括细胞基质、培养基、工艺使用的生物、化学残留物以及毒种相关的有效抗原以外的成分及抗原成分降解物均须严格进行控制，通过工艺研究确定杂质，通过适宜分析方法鉴定，在成品或中间产物阶段检测并制定可接受限度，以最终确保成品疫苗质量。由于鸡胚变异大，因此要进行 SPF 鸡胚来源控制，尽可能保证批间一致性。由于胰酶、新生牛血清是动物来源，需要严格风险控制，进行来源控制与检定。转瓶培养的温度与转速决定了病毒增殖的状态，因此要确定适当的转速与培养温度。采用无血清培养基进行洗换之后，由于不添加抗生素，对无菌的要求更加严格。主种子批与工作种子批的检定与取用须严格遵守 GMP 规定，这是疫苗生产的核心。由于病毒在液体状态下会有效价降低，因此病毒收获、原液合并、半成品配制的保存温度与保存时间必须严格控制。成品的有效期由半成品配制日开始计算。无菌检查是控制疫苗安全性的重要指标，根据 GMP 与企业标准，对每个关键质控环节均需进行无菌检查。麻腮风联合减毒活疫苗的质量标准与单价麻疹腮腺炎风疹疫苗一致，包括：外观、pH 值、水分、渗透压摩尔浓度、病毒滴度、热稳定性试验、无菌检查、异常毒性检查、细菌内毒素、抗生素残留量和 BSA 残留量。特异性的检验项目包括鉴别试验，病毒滴度及热稳定性试验。

鉴别试验

1 原理

麻疹、腮腺炎、风疹疫苗的鉴别试验为微量细胞中和法。在细胞培养中，麻疹、腮腺炎、风疹病毒在特定的细胞上可引起特定的细胞病变，产生独特的镜下形态学改变，在此基础上形成了对麻疹、腮腺炎、风疹疫苗效力的经典测定方法——微量细胞病变法，该方法简单、可靠、重复性好。鉴别试验即在此基础上采用特异性血清与病毒中和后接种细胞使敏感细胞不产生特异性病变，以此特异性鉴别病毒的方法。

2 材料和设备

2.1 抗麻疹病毒特异性免疫血清、抗腮腺炎病毒特异性免疫血清、抗风疹病毒特异性免疫血清。

2.2 麻疹腮腺炎风疹联合减毒活疫苗供试品。

2.3 检定用细胞：传代绿猴肾（Vero）细胞，传代兔肾（RK-13）细胞。两种细胞均用 MEM 细胞培养液于 37℃，传代后 3 到 4 天用于病毒滴定检测。

2.4 MEM 基础培养液、MEM 细胞培养液、96 孔细胞培养板、24 孔细胞培养板、无菌吸管、无菌 tip 头、细胞培养瓶、胰蛋白酶溶液等。

2.5 仪器设备：生物安全柜，CO₂ 培养箱，倒置光学显微镜，37℃ 恒温箱，移液器，低温冰箱等。

3 操作方法

3.1 细胞制备 麻疹腮腺炎风疹联合减毒活疫苗中麻疹、腮腺炎疫苗的鉴别试验使用 Vero

细胞, 风疹疫苗鉴别试验使用 RK-13 细胞。选择经传代培养 3~4 天、镜下观细胞界限清晰、具有立体感、形态好、已生长成片的 Vero 细胞。弃去细胞培养液, 加适量细胞消化液 (以能覆盖细胞面为宜), 置 37℃ 或室温进行消化, 见细胞面出现针尖孔或轻摇细胞边缘有脱落时, 吸尽消化液。用灭菌吸管取数毫升 MEM 细胞培养液充分分散细胞, 细胞计数后用 MEM 细胞培养液将其稀释, 配制成每 1ml 约含 $(1.5 \sim 2.5) \times 10^5$ 个细胞的细胞悬液, 将细胞悬液接种 96 孔细胞培养板, 每孔 100 μ l。置 37℃ CO₂ 培养箱培育至少 30 分钟, 备用。RK-13 细胞的制备同 Vero 细胞。

3.2 抗病毒特异性免疫血清制备 取适量抗麻疹病毒免疫血清、抗腮腺炎病毒免疫血清和抗风疹病毒免疫血清, 用 MEM 细胞培养液将其稀释到工作浓度, 得到特异性免疫血清混合溶液, 备用。

3.3 供试品稀释与病毒中和 取供试品 3 瓶, 每瓶按标示量加入适量无菌注射用水充分溶解, 然后将 3 瓶供试品混匀。将混匀后的供试品在 24 孔板中进行适当倍数的稀释, 使每 1ml 溶液含有的麻疹病毒、腮腺炎病毒分别不低于 500CCID₅₀, 风疹病毒应不低于 100CCID₅₀, 得到供试品稀释液。

疫苗以特异性免疫血清混合溶液进行 10 倍系列稀释, 得到中和供试品; 疫苗以每种配方的特异性免疫血清混合溶液进行 10 倍系列稀释得到病毒对照供试品; 特异性免疫血清混合溶液为免疫血清对照供试品。

将加好供试品的 24 孔细胞培养板置于 20~25℃ 或其他适宜温度中和 90 分钟。

3.4 疫苗病毒接种及培养 将中和后的供试品分别接种于铺有 Vero 细胞和 RK-13 细胞的 96 孔细胞培养板。除特殊情况外, 每批供试品中的中和供试品和病毒对照供试品分别接种 8~10 孔, 每孔 100 μ l。免疫血清对照供试品接种 8~10 孔, 每孔 100 μ l。以 MEM 细胞培养液替代疫苗供试品, 接种 8~10 孔作为正常细胞对照, 每孔 100 μ l。将加好供试品的 Vero 细胞 96 孔细胞培养板于 37℃、5%CO₂ 条件下培养。将加好供试品的 RK-13 细胞 96 孔细胞培养板于 32℃、5%CO₂ 条件下培养。

4 结果与判定

第 7~8 天显微镜下观察并记录细胞病变, 最终判定结果。观察到细胞病变记为“+”, 反之为“-”。麻疹病毒、腮腺炎病毒、风疹病毒应被完全中和, 不应有细胞病变。细胞对照和血清对照不应有任何细胞病变。麻疹病毒、腮腺炎病毒对照参考品的病毒滴度应不低于 500CCID₅₀/ml, 风疹病毒对照参考品的病毒滴度应不低于 100CCID₅₀/ml。检定报告应注明检品名称、检定日期、生产单位、规格剂型、检定依据、检品编号、检品批号等内容, 并记录实验过程中的主要参数、原始数据和实验结果, 并由实验人、复核人签字。

5 复试及注意事项

如果试验结果不符合质量标准, 重复试验 2 次, 两次复试结果全部合格, 判为合格, 否则不合格。

所有试剂均需分析纯或与指定产品相当。

起草人: 崔晓雨

复核人: 李长贵

病毒滴度及热稳定性试验

1 原理

该试验方法为微量细胞病变法。即将病毒按适当稀释度稀释后接种于敏感细胞制备的 96 孔细胞培养板上, 培养适当天数, 以能使 50% 细胞孔发生 CPE 的最高稀释度作为终点, 采用 Karber 法计算病毒滴度的方法。

2 材料和设备

2.1 抗麻疹病毒特异性免疫血清、抗腮腺炎病毒特异性免疫血清、抗风疹病毒特异性免疫血清。

2.2 麻疹腮腺炎风疹联合减毒活疫苗供试品。

2.3 检定用细胞: 传代绿猴肾 (Vero) 细胞, 传代兔肾 (RK-13) 细胞。两种细胞均用 MEM 细胞培养液于 37℃, 传代后 3 到 4 天用于病毒滴定检测。

2.4 MEM 基础培养液、MEM 细胞培养液、96 孔细胞培养板、24 孔细胞培养板、无菌吸管、无菌 tip 头、细胞培养瓶、胰蛋白酶溶液等。

2.5 仪器设备: 生物安全柜, CO₂ 培养箱, 倒置光学显微镜, 37℃ 恒温箱, 移液器, 低温冰箱等。

2.6 病毒滴定参考品: 麻疹减毒活疫苗参考品 310013-200701, 腮腺炎减毒活疫苗参考品 20070401, 风疹减毒活疫苗参考品 310014-200701。参考品的使用: 每次试验均应进行, 内参需由国家标准品标定。

3 操作方法

3.1 细胞制备 (与鉴别试验相同)

3.2 抗病毒特异性免疫血清制备 麻疹腮腺炎风疹联合减毒活疫苗滴度检测采用交叉中和稀释法, 即检测麻疹病毒滴度需中和腮腺炎病毒及风疹病毒; 检测腮腺炎病毒滴度需中和麻疹病毒及风疹病毒; 检测风疹病毒滴度需中和腮腺炎病毒。

3.2.1 取适量抗腮腺炎病毒特异性免疫血清及抗风疹病毒特异性免疫血清, 用 MEM 细胞培养液稀释到工作浓度, 得到抗腮腺炎抗风疹病毒特异性免疫血清稀释液, 备用。

3.2.2 取适量抗麻疹病毒特异性免疫血清及抗风疹病毒特异性免疫血清, 用 MEM 细胞培养液稀释到工作浓度, 得到抗麻疹抗风疹病毒特异性免疫血清稀释液, 备用。

3.2.3 取适量抗腮腺炎病毒特异性免疫血清, 用 MEM 细胞培养液稀释到工作浓度, 得到抗腮腺炎病毒特异性免疫血清稀释液, 备用。

3.3 供试品麻疹病毒滴定

3.3.1 取供试品 3 瓶, 每瓶按标示量加入无菌注射用水充分溶解, 混匀后待用。取做好标记的 24 孔细胞培养板, 每孔加入 1.8ml 抗腮腺炎抗风疹病毒特异性免疫血清稀释液, 第一行每孔分别加入混匀后的供试品, 每孔 0.2ml, 得到 10⁻¹; 混匀后取 0.2ml 加入该列第二行孔中, 得到 10⁻²; 混匀后取 0.2ml 加入该列第三行孔中, 得到 10⁻³; 混匀后取 0.2ml 加入该列第四行孔中, 得到 10⁻⁴。每孔需更换吸管或吸头。将预稀释好的 24 孔板置于 37℃ 或 20~25℃ 中和 60~90 分钟, 中和腮腺炎病毒及风疹病毒。

3.3.2 预稀释病毒滴定国家参考品：取麻疹减毒活疫苗参考品 1 支，加入 0.5ml 无菌注射用水充分溶解。取做好标记的 24 孔细胞培养板，每孔加入 MEM 细胞培养液 1.8ml。将混匀的待检样品在此 24 孔板中进行 10 倍梯度的系列稀释：即取 0.2ml 原倍参考品溶液加入 A1 孔，充分混匀后得到 10^{-1} 参考品稀释液；更换吸管（或 tip 头），从 A1 孔中取 0.2ml 加入 B1 孔，充分混匀后得到 10^{-2} 参考品稀释液；更换吸管（或 tip 头），从 B1 孔中取 0.2ml 加入 C1 孔，充分混匀后得到 10^{-3} 参考品稀释液；更换吸管（或 tip 头），从 C1 孔中取 0.2ml 加入 D1 孔，充分混匀后得到 10^{-4} 参考品稀释液。

3.3.3 将预稀释好的供试品和国家参考品接种铺有 Vero 细胞的 96 孔细胞培养板。除特殊情况外，每批供试品接种三个稀释度，每个稀释度接种 10 孔，每孔 100 μ l。

3.3.4 用 MEM 细胞培养液代替供试品稀释液接种铺有 Vero 细胞的 96 孔细胞培养板中作为正常细胞对照，接种 8~10 孔，每孔 100 μ l。

3.3.5 将加好样品的 96 孔细胞培养板于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 条件下培养。

3.3.6 待供试品腮腺炎病毒滴定与麻疹相似，加入抗麻疹抗风疹病毒特异性免疫血清，其余操作一样。

3.4 待检样品风疹病毒滴定 供试品风疹病毒滴定与麻疹、腮腺炎相似，加入抗腮腺炎病毒特异性免疫血清稀释液，其余操作一样。将预稀释好的供试品和国家参考品接种铺有 RK-13 细胞的 96 孔细胞培养板。除特殊情况外，每批供试品接种三个稀释度，每个稀释度接种 10 孔，每孔 100 μ l。用 MEM 细胞培养液代替供试品稀释液接种铺有 RK-13 细胞的 96 孔细胞培养板中作为正常细胞对照，接种 8~10 孔，每孔 100 μ l。将加好样品的 96 孔细胞培养板于 32 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 条件下培养。

4 结果与判定

麻疹腮腺炎风疹联合减毒活疫苗中麻疹疫苗病毒、腮腺炎疫苗病毒滴度在接种后的第 7~8 天显微镜下观察并记录细胞病变，风疹疫苗病毒滴度在接种后的第 8~10 天显微镜下观察并记录细胞病变。观察到细胞病变记为“+”，反之为“-”。国家参考品的滴定结果应在标示的滴度范围内，并且正常细胞对照不应有任何细胞病变出现，则试验成立。

以能使细胞发生病变的疫苗最高稀释度作为终点，用 Karber 法计算病毒滴度。计算公式为：

$$\log\text{CCID}_{50} = X_m + 1/2d - d \sum p_i / 100$$

式中， X_m 为病毒最高稀释度的对数；

d 为稀释度的对数；

$\sum p_i$ 为每个稀释度病变百分数的总和。

计算举例

待测疫苗 稀释度	细胞观察结果	病毒滴度计算
10^{-2}	+++++	$\log\text{CCID}_{50}/0.1\text{ml}$
10^{-3}	+++++	$= -2 + 0.5 - (100 + 100 + 50) / 100$
10^{-4}	-++-+-	$= -2 + 0.5 - 250 / 100$
10^{-5}	-----	$= -4.0$
备注	实例计算中，得出数值为疫苗稀释度的对数，则病毒含量为其倒数，即 $10^{4.0}\text{CCID}_{50}/0.1\text{ml}$ 或 $10^{5.0}\text{CCID}_{50}/\text{ml}$ ，检定报告中通常以 $5.0\log\text{CCID}_{50}/\text{ml}$ 表示病毒滴度。	

5 复试及注意事项

如果试验结果不符合质量标准，重复试验 2 次，2 次复试结果全部合格，判为合格，否则不合格。

所有试剂均需分析纯或与指定产品相当。

6 热稳定性试验样品处理

每批疫苗取 6~10 支，置 $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中放 7 天（按 24 小时计时）。与处理前的疫苗（基础疫苗）同时进行病毒滴度检测。处理后的疫苗如不及时进行病毒滴度检测，应放置 $2 \sim 8^{\circ}\text{C}$ 保存待检。热稳定性试验应与同批次的病毒滴度同时进行。

起草人：崔晓雨

复核人：李长贵

脊髓灰质炎减毒活疫苗

简 述

脊髓灰质炎减毒活疫苗（Oral Poliomyelitis Vaccine, OPV）以其使用方便、价格低廉、能够有效建立免疫屏障的优势得以在全球推广使用，大幅度降低了脊髓灰质炎的发病率。我国 OPV 使用的毒种主要是由 WHO 提供的 Sabin 株 I 型、III 型毒株和由医学生物学研究所分离建株的中 III 2 型毒株，生产用细胞为人二倍体细胞 2BS 株细胞或胎猴肾细胞。经过细胞复苏、细胞传代扩增培养、病毒接种、病毒收获、原液合并、单价半成品配制、二价半成品配制、分装、包装等过程形成成品。

目前 OPV 主要有液体苗和糖丸两种剂型，其生产流程相似，不同的是糖丸制剂需要在二价半成品制成后，与赋形剂按一定比例混合后制成糖丸。

目前，对于 OPV 的质量标准，欧洲药典、日本药典、印度药典、巴西药典以及 WHO 关于保证（口服）脊髓灰质炎减毒活疫苗质量、安全及效力的推荐规范（OPV_TRS_980）均有收载，但均为针对三价 OPV，2016 年起使用的二价 OPV 的质量标准尚未收载。

在我国，二价 OPV 成品根据疫苗的性状不同而有所区别。口服液体苗的质量控制项目包括：鉴别试验、外观、装量、病毒滴定、热稳定性试验、抗生素残留量、无菌检查和 pH 值。口服糖丸苗的质量控制项目包括：鉴别试验、外观、丸重差异、病毒滴定、热稳定性试验、病毒分布均匀度、微生物限度检查、致病菌检查、乙型溶血性链球菌检查、肠道致病菌检查和大肠埃希菌检查。特异性的检测项目有鉴别试验、病毒总滴度、分型病毒滴度、热稳定性试验、

病毒分布均匀度，以下将分别介绍。

鉴别试验

1 原理

脊髓灰质炎病毒能够感染细胞产生致细胞病变效应，特异性的抗病毒免疫血清（中和抗体）与相应的病毒特异性地结合，能够抑制病毒对敏感细胞的吸附、穿入和脱壳，从而阻止病毒的繁殖，使病毒失去对敏感细胞的致病力。试验通过适量 I 型、III 型混合脊髓灰质炎病毒特异性免疫血清与适量疫苗病毒液混合，置 37℃ 中和 2 小时，接种 Hep-2 细胞或其他敏感细胞，置 35.5℃ ± 0.5℃ 培养，7 天判定结果，如疫苗中无其他微生物，则细胞无病变出现。同时设血清和细胞对照，均应为阴性。病毒对照应为阳性。

2 材料和设备

2.1 材料

2.1.1 I 型 III 型脊髓灰质炎减毒活疫苗、Hep-2 细胞、PBS 液、0.25% 胰蛋白酶、二甲基亚砷、0.4% 台盼蓝、微量细胞培养板、移液器、吸头、无菌移液管、冻存管、深孔板。

2.1.2 参考品 抗脊灰病毒免疫血清参考品。

目前抗脊灰病毒免疫血清国际标准品的各型中和抗体浓度较低，仅用于内部参考品的溯源标定。

我国的抗脊灰病毒免疫血清参考品有两种，分别包括 I 型和 III 型参考品。本试验中，特异性抗脊灰病毒免疫血清参考品主要用于中和病毒。由于血清参考品的型特异性中和抗体效价已知，将其稀释至适合浓度，与病毒液中和，通过中和液是否能使细胞病变判断疫苗中是否混合其他微生物。

2.2 设备 恒温水浴箱、生物安全柜、二氧化碳培养箱、倒置光学显微镜。

2.3 溶液配制

2.3.1 细胞培养液：向 MEM 培养液中加入 10% 新生牛血清，1% 双抗。

2.3.2 病毒稀释液：向 MEM 培养液中加入 1% 双抗。

3 操作方法

3.1 细胞准备

3.1.1 细胞复苏 在不加任何条件下直接冻存细胞时，细胞内和外环境中的水都会形成冰晶，能导致细胞内发生机械损伤、电解质升高、渗透压改变、脱水、pH 改变、蛋白变性等，能引起细胞死亡。如向培养液加入保护剂，可使冰点降低。在缓慢的冻结条件下，能使细胞内水分在冻结前透出细胞。贮存在 -130℃ 以下的低温中能减少冰晶的形成。细胞复苏时速度要快，使之迅速通过细胞最易受损的 -5~0℃，细胞仍能生长，活力受损不大。目前常用的保护剂为二甲基亚砷和甘油，它们对细胞无毒性，分子量小，溶解度大，易穿透细胞。

3.1.1.1 细胞实验室进行常规消毒，紫外照射 40 分钟以上。

3.1.1.2 将培养液、0.25% 胰蛋白酶在恒温水浴箱中 37℃ 预热 30 分钟，备用。准备一个 1000ml 的烧杯，内装 2/3 杯 37℃ 的温水。

3.1.1.3 从液氮保存罐中取出冻存管，立即放入 37℃ 温水中，快速摇晃，直至冻存液完全

融化。

3.1.1.4 将细胞悬液移入 15ml 离心管，缓慢加入 4ml 培养液，以 1000 转/分钟的转速离心 5 分钟。

3.1.1.5 弃掉上清，用培养液悬液混悬沉淀细胞，吹打均匀，调整细胞浓度，分装到培养瓶中，放入 37℃ 5% CO₂ 培养箱中培养。

3.1.1.6 记录复苏日期。

3.1.2 细胞传代 细胞在培养瓶长成致密单层后，已基本饱和，为使细胞能继续生长，同时也将细胞数量扩大，必须进行传代。

3.1.2.1 传代前准备

3.1.2.1.1 预热培养用液：把已经配制好的细胞培养液、PBS 液和细胞消化液放入 37℃ 水浴锅内预热。

3.1.2.1.2 细胞实验室进行常规消毒，紫外照射 40 分钟以上。

3.1.2.1.3 正确摆放使用的细胞瓶等材料：保证足够的操作空间，不仅便于操作而且可减少污染。

3.1.2.1.4 取出预热好的培养用液：取出已经预热好的培养用液，用医用酒精棉球擦拭好后方能放入生物安全柜内。

3.1.2.1.5 从培养箱内取出细胞：注意取出细胞时要旋紧瓶盖，用医用酒精棉球擦拭显微镜的台面，再在镜下观察细胞。

3.1.2.1.6 将细胞放入生物安全柜中。

3.1.2.2 胰蛋白酶消化

3.1.2.2.1 加入消化液：小心吸出旧培养液，用 PBS 清洗 2 遍，加入适量细胞消化液（0.25% 胰蛋白酶），注意消化液的量以盖住细胞最好，最佳消化温度是 37℃。

3.1.2.2.2 显微镜下观察细胞：倒置显微镜下观察消化细胞，若胞质回缩，细胞之间不再连接成片，表明此时细胞消化适度。

3.1.2.2.3 吸弃消化液加入培养液：弃去胰蛋白酶液，注意更换吸管，加入细胞培养液。

3.1.2.3 吹打分散细胞

3.1.2.3.1 吹打制悬：用移液管将已经消化细胞吹打成细胞悬液。

3.1.2.3.2 吸细胞悬液入离心管：将细胞悬液吸入 10ml 离心管中。

3.1.2.4 细胞计数 培养的细胞在一般条件下要求有一定的密度才能生长良好，所以要进行细胞计数。计数结果以每毫升细胞数表示。细胞计数的原理和方法与血细胞计数相同。

用台盼蓝染细胞，死细胞着色，活细胞不着色，从而可以区分死细胞与活细胞。利用细胞内某些酶与特定的试剂发生显色反应，也可测定细胞相对数和相对活力。当待测细胞悬液中细胞均匀分布时，通过测定一定体积悬液中的细胞的数目，即可换算出每毫升细胞悬液中细胞的细胞数目。

取一套血球计数板，将特制的盖玻片盖在血球计数槽上。

制备计数用的细胞悬液：将细胞悬液稀释至合适浓度，用移液器吸取细胞悬液到一离心管中，加入等体积的 0.4% 台盼蓝染液（细胞悬液和台盼蓝染液的比例可根据需要适当调整）。活细胞不会被染色，加入染液后就可以在显微镜下区别活细胞和死细胞。

将细胞悬液滴入计数板：将待测细胞悬液吹均匀，然后吸取少量悬液沿盖片边缘缓缓滴入，要保证盖片下充满悬液，注意盖片下不要有气泡，也不能让悬液流入旁边槽中。

统计四个大格的细胞数：将血球计数板放于显微镜的低倍镜下观察，并移动计数板，当看到镜中出现计数方格后，数出四角的四个大格（每个大格含有 16 个中格）中没有被染液染上色的细胞数目。

计算原细胞悬液的细胞数，按照下面公式计算细胞密度：

$$\text{细胞悬液的细胞数/ml} = (\text{四个大格细胞数}/4) \times 2 \times 10^4$$

式中，4 是因为计数了 4 个大格的细胞数；2 是稀释倍数，因细胞悬液：染液=1:1 稀释； 10^4 是因计数板中每一个大格的体积为： $1.0\text{mm} \times 1.0\text{mm} \times 0.1\text{mm} = 0.1\text{mm}^3$ 而 $1\text{ml} = 1000\text{mm}^3$ 。

例如：四个大格细胞数为 200，则细胞浓度为 $200/4 \times 2 \times 10^4 = 10^6$ 个/ml。配制 100ml 浓度为 10^5 个/ml 的细胞悬液，需要 $100 \times 10^5/10^6 = 10\text{ml}$ ，即取 10ml 消化后的细胞悬液，加入 90ml 细胞培养液，即为工作浓度细胞悬液。

3.1.2.5 滴定用细胞悬液和培养用细胞悬液的制备

3.1.2.5.1 滴定用细胞悬液的制备：根据细胞计数的结果，用细胞培养液将细胞制成约 $1.0 \times 10^5 \sim 2.5 \times 10^5$ 个/ml 的细胞悬液，放 4°C 冰箱备用，用时混匀。

3.1.2.5.2 培养用细胞悬液的分装：将细胞悬液吸出以合适的数量分装至培养瓶中，加入适量培养基旋紧瓶盖。

3.1.2.5.3 显微镜下观察细胞：倒置显微镜下观察细胞形态及数量，做好标记。

3.1.3 细胞冻存 对于状态良好、代次合适的细胞，可以利用冻存技术将细胞置于 -196°C 液氮中低温保存，使细胞暂时脱离生长状态而将其细胞特性保存起来，这样在需要的时候再复苏细胞用于实验。

3.1.3.1 将消化好的细胞悬液收集至离心管中，1000 转/分钟离心 10 分钟，弃上清液。

3.1.3.2 沉淀加含二甲基亚砜的细胞培养液，计数，调整至 $5 \times 10^6/\text{ml}$ 左右。

3.1.3.3 将悬液分至冻存管中，每管 1ml。

3.1.3.4 标记，写明细胞种类、代次、冻存日期等信息。

3.1.3.5 放入细胞冻存盒置于 -80°C 冰箱中以 $1^\circ\text{C}/\text{min}$ 的速度梯度降温，过夜后置于液氮中长期保存。

3.2 抗脊灰病毒分型免疫血清的制备 取 I 型、III 型抗脊髓灰质炎病毒免疫血清，根据其中和效价，用血清稀释液将每型血清稀释后混合。使每型血清的使用浓度为 20~40 个中和单位，备用。

3.3 供试品稀释 在深孔板上标明供试品批号及稀释度。每孔加病毒稀释液 3.6ml。将供试品进行 10 倍系列稀释：即吸取 400 μl 供试品原液，加于第 1 孔中（ 10^{-1} ），换吸头吸取第 1 孔内经充分混匀后的供试品稀释液 400 μl ，加于第 2 孔中（ 10^{-2} ），如此 10 倍递增稀释至 10^{-4} 。根据供试品实际滴度可适当调整稀释终点。

对于糖丸剂型的疫苗，应预先用溶解液按比例充分溶解后，再进行 10 倍系列稀释至所需稀释度。

3.4 供试品接种及培养 将 10^{-4} 的供试品稀释液接种于 96 孔微量组织培养板中，根据供试品实际滴度可适当调整供试品的接种稀释度。50 $\mu\text{l}/\text{孔}$ ，加入稀释好的抗血清 50 $\mu\text{l}/\text{孔}$ ；置 37°C 中和 2 小时。

取出制备好的细胞悬液加板，100 $\mu\text{l}/\text{孔}$ ，轻摇板子混匀，放置 5%二氧化碳培养箱 $35.5^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$ 培养，7 天判定结果。

4 结果判定

细胞对照：每次供试品滴定时应至少有 8 孔细胞对照，以病毒稀释液替代供试品，细胞对照不应有细胞病变出现。

血清对照：应设 8 孔血清对照，以病毒稀释液替代供试品，血清对照不应有任何细胞病变出现。

病毒对照：应加 8 孔稀释至 10^{-4} 的供试品稀释液，最终判定结果，应有病变出现。

以上对照符合要求，试验成立。经中和后的供试品稀释液接种细胞应无病变出现。

5 注意事项

5.1 细胞复苏

5.1.1 取细胞的过程中注意带好防冻手套，护目镜。此项尤为重要，细胞冻存管可能漏入液氮，解冻时冻存管中的气温急剧上升，可导致爆炸。

5.1.2 在常温下，二甲基亚砜对细胞的毒副作用较大，因此，必须在 1~2 分钟内使冻存液完全融化。如果复苏太慢，会造成细胞的损伤。

5.1.3 离心前须加入少量培养液。细胞解冻后二甲基亚砜浓度较高，注意加入少量培养液可稀释其浓度，以减少对细胞的损伤。

5.2 细胞计数

5.2.1 进行细胞计数时，要求悬液中细胞数目不低于 10^4 个/ml，如果细胞数目很少要进行离心再悬浮于少量培养液中；细胞悬液中的细胞应分散良好，否则影响计数准确。取样计数前，应充分混匀细胞悬液，尤其是多次取样计数时更要注意每次取样都要混匀，以求计数准确；

5.2.2 计数细胞的原则是只数完整的细胞，若细胞聚集成团时，只按照一个细胞计算。如果细胞压在格线上时，则只计上线，不计下线，只计左线，不计右线。操作时，注意盖片下不能有气泡，也不能让悬液流入旁边槽中，否则要重新计数。

5.3 严格的无菌操作；适度消化：消化的时间受消化液的种类、配制时间、加入培养瓶中的量等诸多因素的影响，消化过程中应该注意培养细胞形态的变化，一旦胞质回缩，连接变松散，或有成片浮起的迹象就要立即终止消化。新生牛血清在使用前需在 56°C 灭活 30 分钟。

5.4 液氮操作时应小心，以免液氮冻伤。液氮定期检查，随时补充。

病毒总滴度测定法

1 原理

脊髓灰质炎病毒在敏感细胞系可出现细胞病变，引起致细胞病变效应。以不同稀释度病毒接种于细胞，以出现 50% 细胞病变的最高病毒稀释度计为病毒滴度。

2 材料和设备

2.1 材料

2.1.1 I 型 III 型脊髓灰质炎减毒活疫苗、Hep-2 细胞、PBS 液、0.25% 胰蛋白酶、二甲基亚砜、0.4% 台盼蓝；微量细胞培养板、移液器、吸头、无菌移液管、冻存管，深孔板。

2.1.2 参考品 脊髓灰质炎疫苗病毒滴定参考品。

脊髓灰质炎病毒的滴度采用生物学方法进行测定，方法本身变异性较大，因此参考品或标准品是生产和质控检定中必不可少的环节，在生物制品标准化、质量控制和效力评估中起着非常重要的作用。

Sabin 脊髓灰质炎减毒活疫苗的 WHO 国际标准品由英国国家生物制品检定所制备，包括 Sabin 单价 I 型脊髓灰质炎疫苗国际标准品，Sabin 单价 II 型脊髓灰质炎疫苗国际标准品，Sabin 二价 I 型 III 型脊髓灰质炎疫苗国际标准品。由于野生 II 型脊髓灰质炎病毒于 2015 年被证实为全球根除，II 型脊髓灰质炎疫苗及国际标准品仅用于战略储备，以应对现在和根除后时代的爆发。Sabin 二价 I 型 III 型脊髓灰质炎疫苗国际标准品包括 I 型 III 型病毒株。以上国际标准品经协同标定后赋值，均可用于病毒滴度 $CCID_{50}$ 测定或国家参考品、内部参考品的标定。

我国的相关参考品包括脊髓灰质炎疫苗病毒滴定参考品 I 型和脊髓灰质炎疫苗病毒滴定参考品 III 型，并与国际标准品溯源。用于病毒滴度测定过程中判定实验的有效性，病毒参考品的滴定结果在标示的滴度范围内，表明试验有效。

2.2 设备 恒温水浴箱、生物安全柜、二氧化碳培养箱、倒置光学显微镜。

2.3 溶液制备

2.3.1 细胞培养液：向 MEM 培养液中加入 10% 新生牛血清，1% 双抗。

2.3.2 病毒稀释液：向 MEM 培养液中加入 1% 双抗。

3 操作方法

3.1 细胞准备 操作方法参照鉴别试验。

3.2 供试品稀释 在深孔板上标明供试品批号及稀释度。每孔加病毒稀释液 3.6ml。将供试品进行 10 倍系列稀释：即用吸取 400 μ l 供试品原液，加于第 1 孔中（ 10^{-1} ），换吸头吸取第 1 孔内经充分混匀后的供试品稀释液 400 μ l，加于第 2 孔中（ 10^{-2} ），如此 10 倍递增稀释至 10^{-8} 。根据供试品实际滴度可适当调整稀释终点。

对于糖丸剂型疫苗，应预先用溶解液按比例充分溶解后，再进行 10 倍系列稀释至所需稀释度。

3.3 供试品接种及培养 在微量细胞培养板中分别加入病毒稀释液，50 μ l/孔。从供试品的 10^{-5} 稀释度开始接种于 96 孔微量组织培养板中，50 μ l/孔，每个稀释度 8 孔，根据供试品实际滴度可适当调整接种稀释度。取出制备好的细胞悬液加板，100 μ l/孔，轻摇板子混匀，放置 5% 二氧化碳培养箱 $35.5^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 培养，7 天判定结果。

3.4 病毒参考品的滴定和正常细胞对照的设立

3.4.1 病毒参考品对照 病毒参考品的滴定方法、结果判定及计算方法同供试品。病毒参考品的滴定结果在标示的滴度范围内，该试验有效。

3.4.2 细胞对照 每次供试品滴定时应至少有 8 孔正常细胞对照，以病毒稀释液替代供试品，每孔 100 μ l。正常细胞对照不应有任何细胞病变出现。

4 结果计算

不同稀释度供试品接种后的第 7 天显微镜下观察细胞病变，最终判定结果。以能使细胞发生病变的供试品最高稀释度作为终点。在显微镜下观察到细胞病变记为“+”，否则记为“-”。用 Karber 法计算病毒滴度。

$$\log CCID_{50} = L - d(S - 0.5)$$

式中, L 为病毒最高浓度稀释度的对数; d 为稀释度系数(倍数)的对数; S 为每个稀释度病变比率的总和。

例如: 实验结果为如下。

病毒液稀释度	出现 CPE 孔数	出现 CPE 孔的比率
10^{-5}	8	$8/8=1$
10^{-6}	6	$6/8=0.75$
10^{-7}	1	$1/8=0.125$
10^{-8}	0	$0/8=0$

$$L = -5.0$$

$$d = 1.0$$

$$S = 1 + 0.75 + 0.125 = 1.875$$

$$\log \text{CCID}_{50} = -5 - 1.875 + 0.5 = -6.375$$

$$\text{病毒滴度} = 6.375 \lg \text{CCID}_{50} / 50 \mu\text{l}$$

根据供试品的用量计算每 1 人用剂次的病毒滴度, 根据质量标准的要求以“奇进偶不进”的原则保留适当小数位数。如每 1 人用剂次用量为 $100 \mu\text{l}$, 则病毒总滴度为 $6.38 + 0.30 = 6.68 \lg \text{CCID}_{50} / \text{剂}$ 。

5 结果判定

病毒滴度应该在质量标准范围内, 即为符合规定。

6 注意事项

注意事项同鉴别试验。

分型病毒滴度测定法

1 原理

由于 I 型 III 型脊髓灰质炎减毒活疫苗为 I 型和 III 型减毒病毒株的混合, 测定各型病毒滴度需要分别使用特异性 I 型、III 型中和抗体将疫苗中的 I 型、III 型病毒中和, 再根据 CCID_{50} 原理, 测定 III 型和 I 型病毒滴度。

2 材料和设备

2.1 材料

2.1.1 I 型 III 型脊髓灰质炎减毒活疫苗、Hep-2 细胞、PBS 液、0.25% 胰蛋白酶、二甲基亚砜、0.4% 台盼蓝; 微量细胞培养板、移液器、吸头、无菌移液管、冻存管、深孔板。

2.1.2 参考品 脊髓灰质炎疫苗病毒滴定参考品、抗脊灰病毒免疫血清参考品。

脊髓灰质炎病毒的分型滴度采用生物学方法进行测定, 方法本身变异性较大, 因此参考品或标准品是生产和质检检定中必不可少的环节, 在生物制品标准化、质量控制和效力评估中起

着非常重要的作用。

Sabin 脊髓灰质炎减毒活疫苗的病毒滴度 WHO 国际标准品由英国国家生物制品检定所制备, 包括 Sabin 单价 I 型脊髓灰质炎疫苗国际标准品, Sabin 单价 II 型脊髓灰质炎疫苗国际标准品, Sabin 二价 I 型 III 型脊髓灰质炎疫苗国际标准品。由于野生 II 型脊髓灰质炎病毒于 2015 年被证实为全球根除, II 型脊髓灰质炎疫苗国际标准品仅用于战略储备, 以应对现在和根除后时代的爆发。Sabin 二价 I 型 III 型脊髓灰质炎疫苗国际标准品包括 I 型 III 型病毒株。以上国际标准品经协同标定后赋值, 均可用于病毒滴度 $CCID_{50}$ 测定或国家参考品、内部参考品的标定。

我国的相关参考品包括脊髓灰质炎疫苗病毒滴定国家参考品 I 型和脊髓灰质炎疫苗病毒滴定国家参考品 III 型, 并与国际标准品溯源。用于病毒滴度测定过程中判定实验的有效性, 病毒参考品的滴定结果在标示的滴度范围内, 表明试验有效。

目前抗脊灰病毒免疫血清国际标准品的各型中和抗体浓度较低, 仅用于内部参考品的溯源标定。且该国际标准品为 I 型、II 型和 III 型中和抗体混合血清, 因此不能用于分型滴度测定。

我国的抗脊灰病毒免疫血清参考品有两种, 分别包括 I 型和 III 型血清参考品。本试验中, 特异性抗脊灰病毒免疫血清参考品主要用于中和相应型别的病毒, 例如使用 I 型血清参考品中和 I 型病毒, 以通过 $CCID_{50}$ 法测定 III 型病毒滴度。

2.2 设备 恒温水浴箱、生物安全柜、二氧化碳培养箱、倒置光学显微镜。

2.3 溶液配制

2.3.1 细胞培养液: 向 MEM 培养液中加入 10% 新生牛血清, 1% 双抗。

2.3.2 病毒稀释液: 向 MEM 培养液中加入 1% 双抗。

3 操作方法

3.1 细胞准备 细胞状态是实验有效的关键。操作方法同鉴别试验。

将细胞制成约 $1.0 \times 10^5 \sim 2.5 \times 10^5$ 个/ml 的细胞悬液, 放 4°C 冰箱备用, 用时混匀。

3.2 抗脊灰病毒分型免疫血清的制备 根据血清的中和单位进行工作浓度的分型抗血清制备。I 型抗血清、III 型抗血清制备浓度为 3 单位/型/ml。

3.3 供试品稀释 在深孔板上标明供试品批号及稀释度。每孔加病毒稀释液 3.6ml。将供试品进行 10 倍系列稀释: 即吸取 400 μl 供试品原液, 加于第 1 孔中 (10^{-1}), 换吸头吸取第 1 孔内经充分混匀后的供试品稀释液 400 μl , 加于第 2 孔中 (10^{-2}), 如此 10 倍递增稀释至 10^{-8} 。根据供试品实际滴度可适当调整稀释终点。

对于糖丸型疫苗, 应预先用溶解液按比例充分溶解后, 再进行 10 倍系列稀释至所需稀释度。

3.4 供试品接种及培养 将配制的分型抗血清工作液也分别加入 96 孔细胞培养板中, 50 μl /孔。分别加入等量不同稀释度的供试品, 根据供试品实际滴度可适当调整接种稀释度, 50 μl /孔, 每个稀释度接种 8 孔, 37°C 中和 2 小时, 中间振荡一次。加入已准备好的细胞悬液, 100 μl /孔。置二氧化碳培养箱 $35.5^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$ 培养, 7 天判定结果。

3.5 对照系统设立

3.5.1 抗血清对照 将分型抗血清工作液分别加入细胞培养板中, 50 μl /孔。分别加入等量的细胞培养液, 50 μl /孔, 每个组合血清应至少有 8 孔, 37°C 中和 2 小时, 中间振荡一次。再加入已准备好的细胞悬液, 100 μl /孔。置二氧化碳培养箱 $35.5^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$ 培养, 7 天判定结果。不

应有细胞病变出现。

3.5.2 细胞对照 每次供试品滴定时应有至少 8 孔细胞对照，以病毒稀释液替代供试品，每孔 100 μ l。细胞对照不应有细胞病变出现。

3.5.3 病毒参考品对照 病毒参考品的滴定方法、结果判定及计算方法同供试品的检测。病毒参考品的滴定结果在标示的滴度范围内，该试验有效。

4 结果计算

不同稀释度供试品接种后的第 7 天显微镜下观察细胞病变，最终判定结果。以能使细胞发生病变的供试品最高稀释度作为终点。在显微镜下观察到细胞病变记为“+”，否则记为“-”。用 Karber 法计算病毒滴度。计算方法同病毒总滴度测定。

5 结果判定

病毒滴度应在质量标准范围内，即为符合规定。

6 注意事项

注意事项同鉴别试验。

热稳定性试验

1 原理

同病毒总滴度测定。

2 材料和设备

同病毒总滴度测定。

3 操作方法

3.1 供试品孵育 将供试品置 37 $^{\circ}$ C \pm 0.5 $^{\circ}$ C 培养箱中持续孵育 48 小时。处理后的供试品与未处理的供试品同时进行病毒滴度检测。

3.2 测定 同病毒总滴度测定。

4 结果计算

同病毒总滴度测定。

5 结果判定

37 $^{\circ}$ C 孵育 48 小时，病毒滴度下降应在质量标准范围内，即为符合规定。

6 注意事项

同鉴别试验。

丸重差异检查法

1 原理

为控制每丸重量的一致性，采用重量差异检查法，考察疫苗丸重的均一性是否符合药品标准规定。

2 材料和设备

- 2.1 材料 I 型 III 型脊髓灰质炎减毒活疫苗、称量纸、无菌镊子。
- 2.2 设备 电子天平。

3 操作方法

取规定数量的糖丸，按分析天平操作细则逐粒称重，详细记录。

4 结果计算和判定

每粒糖丸重量在标准范围内判为符合规定。

5 注意事项

- 5.1 试验过程中，应使用镊子夹持供试品，不得徒手操作。
- 5.2 不要破坏糖丸的完整性。

病毒分布均匀度检查法

1 原理

对于糖丸剂型疫苗，考察不同粒糖丸中病毒含量的均一性。脊髓灰质炎病毒在敏感细胞系可出现细胞病变，引起致细胞病变效应。以不同稀释度病毒接种于细胞，以出现 50% 细胞病变的最高病毒稀释度计为病毒滴度。

2 材料和设备

同病毒总滴度测定。

3 操作方法

3.1 细胞准备 操作方法参照鉴别试验。将细胞制成约 $1.0 \times 10^5 \sim 2.5 \times 10^5$ 个/ml 的细胞悬液，放 4℃ 冰箱备用，用时混匀。

3.2 供试品稀释 取 10 粒糖丸，分别放入 10 个容器中，每个加入病毒稀释液至 10ml 震荡溶解，直到糖丸完全溶化后备用，即为 10 倍稀释液。在深孔板上 10 倍系列稀释至 10^{-8} 。根据供试品实际滴度可适当调整稀释终点。

3.3 供试品接种及培养 同病毒总滴度测定。

3.4 病毒参考品的滴定和正常细胞对照的设立 同病毒总滴度测定。

4 结果计算

同病毒总滴度测定。计算 10 粒糖丸中病毒滴度最大值与最小值之差，即极差。

5 结果判定

病毒含量差在质量标准范围内，即为符合规定。

6 注意事项

同鉴别试验。

起草人：刘悦越 于晴川 高加梅

复核人：国泰

脊髓灰质炎灭活疫苗

简 述

脊髓灰质炎（简称脊灰）系由脊灰病毒感染引起，主要通过粪口途径传播的以肢体麻痹为主的急性传染病，多发于婴幼儿及儿童，因此又被称为“小儿麻痹症”。脊灰病毒属于小核糖核酸（RNA）病毒科（*Picornaviridae*），肠道病毒属（*Enteroviruse*）。病毒大小为 27~30nm，基因组包含单股正链 RNA，长约 7500bp，包括 I、II 及 III 型三种血清型，不同血清型抗体无交叉保护。

脊灰疾病没有有效的治疗方法，接种疫苗是预防和控制脊灰的有效手段。脊灰灭活疫苗（Inactivated Poliovirus Vaccine, IPV）大体技术是将 I 型 Mahoney 株、II 型 MEF-1 株、III 型 Saukett 株脊灰病毒在猴肾细胞上培养后经浓缩纯化甲醛灭活制得澄清透明的液体制剂，每 1 次人用剂量为 0.5ml，含有效抗原成分 I 型 40 单位、II 型 8 单位和 III 型 32 单位，2~8℃ 保存，有效期 36 个月。

我国的脊髓灰质炎灭活疫苗以 Sabin 株生产，简称 sIPV，有两个企业获得批准。

sIPV 生产使用毒种为减毒 Sabin 株，均来自 WHO，生产工艺与传统 IPV 基本相同，系将减毒 Sabin 株 I 型、II 型和 III 型（或 III 型 Pfizer 株）分别接种 Vero 细胞培养收获病毒，同样经浓缩、纯化、甲醛彻底灭活，按比例混合制成三价液体疫苗，每一次人用剂量 0.5ml，含有效抗原成分 I 型 15 或 30 单位、II 型 32 或 45 单位、III 型 45 单位，2~8℃ 保存，有效期 24 个月。

目前，脊灰灭活疫苗质量控制检验用国际或国家标准品主要针对体外效力试验，即 D 抗原含量检测。现行的野毒株 IPV 疫苗 D 抗原含量国际标准品是 2013 年批准的第三代国际标准品，

NIBSC 编号 12/104, 含量分别为 I 型 (Mahoney 株) 277DU/ml、II 型 (MEF 株) 65DU/ml 和 III 型 (Saukett 株) 248DU/ml, 于 -70°C 保存。中国食品药品检定研究院于 2016 年研制 sIPV 疫苗 D 抗原含量国家标准品, 批准文号为 (2016) 国生标字 0034, 含量分别为 I 型 180DU/ml、II 型 191DU/ml 和 III 型 243DU/ml, 于 -70°C 保存。2018 年 WHO 生物制品标准委员会正式批准第一代 sIPV 国际标准品, 中检院参与了该标准品的国际协作标定研究, NIBSC 编号为 17/160, I、II 和 III 型含量均为 100SDU/ml。

脊髓灰质炎灭活疫苗制品尚未载入《中国药典》。检定项目、标准要求及检验方法依照现行版《中国药典》和其他国家药品标准检测。传统 IPV 以及 sIPV 两种疫苗成品的检定项目大致相同, 包括但不限于外观、装量、pH 值、蛋白质含量、牛血清白蛋白残留量、游离甲醛含量、2-苯氧乙醇含量、无菌检查、异常毒性检查、鉴别试验及 D 抗原含量、细菌内毒素含量、Vero 细胞 DNA 残留量、Vero 细胞蛋白质残留量以及抗生素残留量。

值得注意的是, IPV 效力检测应包含两个方面: 体外试验, 即 D 抗原含量检测; 体内试验, 即大鼠效力试验。WHO《Recommendations of assure the quality, safety and efficacy of poliomyelitis vaccines (inactivated)》(2014) 规定每一批 IPV 半成品都必须进行疫苗体内效力检测, 在保证生产一致性的前提下, 疫苗成品可只进行体外试验的效力检测。

鉴别试验及 D 抗原含量测定法

1 原理

完整的病毒颗粒为 D 抗原, 可诱导机体产生保护性中和抗体, D 抗原含量临床证明与疫苗效力具有相关性。采用酶联免疫法 (ELISA) 测定 D 抗原含量, 是体外评价疫苗效力的关键指标。通常采用双抗体夹心法测定供试品中病毒抗原, 并以抗原标准品或者参考品为标准, 计算供试品中抗原含量。

2 材料和设备

- 2.1 包被液、稀释液、洗板液、封闭液、底物、终止液。
- 2.2 捕获抗体: 纯化获得的各型抗 polio IgG。
- 2.3 检测抗体: 纯化获得的各型抗 polio IgG。
- 2.4 酶标抗体: 商品化 IgG-HRP。
- 2.5 96 孔酶标板。
- 2.6 恒温培养箱、酶标仪等。

3 操作方法

3.1 包板 用包被液将各型捕获抗体按一定比例稀释后加入酶标板, 每孔 $100\mu\text{l}$, 适宜温度放置过夜。

3.2 封闭 洗板甩干后, 加封闭液每孔 $200\mu\text{l}$, 适宜温度放置 1~2 小时后, 拍干。

3.3 加抗原 用稀释液将标准品或参考品以适宜浓度开始进行倍比稀释, 供试品稀释至标准品或参考品范围内, 取合适的稀释度进行测定。每个稀释度复孔, 每孔 $100\mu\text{l}$, 适宜温度放置合适时间。含佐剂的联苗制品稀释之前, 需加适量的解吸附剂处理。

3.4 加检测抗体 洗板拍干后, 用稀释液将各型检测抗体稀释至适宜浓度, 每孔

100 μ l, 适宜温度放置 1 小时。

3.5 加酶标抗体 洗板拍干后, 用稀释液将酶标抗体稀释至适宜浓度, 每孔 100 μ l, 适宜温度放置 1 小时。

3.6 显色 洗板拍干后, 每孔加入底物显色液 100 μ l, 室温或 37 $^{\circ}$ C 放置合适的时间。

3.7 终止 加终止液每孔 50 μ l。

3.8 检测 酶标仪合适波长下读取吸光值, 记录各孔吸收值。

4 计算

将标准品或参考品各稀释度的吸光值, 进行四参数曲线或者直线回归, 分别获得三型别标准曲线; 选取供试品位于标准曲线范围内的稀释度, 以平行线法或者代入直线回归方程, 乘以稀释倍数, 计算出供试品 D 抗原浓度。

5 结果与判定

标准曲线回归系数 $R^2 \geq 0.97$, 实验成立。

鉴别判定: 供试品原倍吸光值高于阴性对照吸光值的 2 倍以上, 即为阳性, 否则为阴性。D 抗原含量检测在批准的标准范围内, 即为合格。

6 注意事项

6.1 目前该检测方法尚未统一, 不同厂家的检测方法细节比如抗体种属来源、试剂配方、加样量、反应条件等不尽相同, 本文列举的方法仅作为参考, 具体操作应参照由国家药品监管部门批准的国家药品标准。

6.2 Sabin 株脊髓灰质炎灭活疫苗 D-抗原的检测应与 D-抗原国家标准品 [批准文号 (2016) 国生标字 0034] 具有可追溯性。

起草人: 江征

复核人: 李长贵

1. 疫苗效价检测方法

1 原理

用于检测 IPV 所能引起的免疫应答, 该试验与疫苗在人体内产生的抗体反应有较好的一致性。对大鼠进行单剂肌肉接种, 21 天后采血测定血清中中和抗体的含量, 不仅可以通过抗体阳转率反映疫苗免疫原性的强弱, 还可以定量检测血清中各型中和抗体的滴度。

2 材料和设备

2.1 Waster 大鼠, 体重 175 ~ 200g, 每组中单个鼠的体重不超过平均体重的 20%。雌性或雌雄性别组内均匀分布。

2.2 Hep2 细胞。

2.3 Sabin I 型、II 型、III 型病毒悬液。

- 2.4 M199 培养液或 MEM 培养基。
- 2.5 96 孔细胞培养板。
- 2.6 细胞培养液：含有 10%牛血清、1%青链霉素、1%碳酸氢钠和 1%谷氨酰胺的 MEM 培养基。
- 2.7 病毒维持液：含有 4%牛血清、1%青链霉素、1%碳酸氢钠和 1%谷氨酰胺的 MEM 培养基。
- 2.8 CO₂ 培养箱、倒置光学显微镜等。

3 操作方法

3.1 稀释疫苗 将参考疫苗采用 MEM（或 M199）培养基稀释至与供试品相同的浓度，然后按照 1:3 进行连续稀释，试验中使用 1:1、1:3、1:9、1:27 与 1:81 至少五个稀释度。

3.2 接种大鼠 试验动物按照供试品、参考疫苗分别分成五个稀释小组，每组和阴性对照组各 10 只大鼠。大鼠免疫前采血，每只 1ml，分离血清作为免前血清对照。每只大鼠双后肢大腿肌内注射稀释样品 0.5ml，阴性对照组每只接种 M199 培养液 0.5ml。饲养 20~22 天后采血分离血清，测定中和抗体。

3.3 测定中和抗体 血清于 56℃灭活 30 分钟，在 96 空细胞板中起始 1:4 稀释后进行 2 倍系列稀释，每孔 50μl，然后加入 100CCID₅₀/孔对应型别脊灰病毒悬液，35℃±1℃中和 3 小时，再加入 Hep2 细胞约 1.0×10⁴ 个/孔，35℃±1℃培养 7 天后观察细胞病变情况，并记录结果。试验同时设置病毒回滴对照和阳性质控血清对照。

4 计算

以 50%细胞孔不产生病变的血清最高稀释度的倒数作为血清抗体效价。中和抗体滴度≥1:4 为阳转，计算每份血清的阳转率，并根据抗体滴度计算 GMT。使用统计软件分析比较供试品与参考疫苗的剂量反应关系。以稀释倍数分别计算供试品和参考疫苗各型的 ED₅₀。

5 结果判定

满足试验有效性的前提下，对于三个脊灰病毒型别，供试品的效力应不显著低于参考疫苗，则供试品有效性符合规定。

6 判定试验有效性的标准

- 6.1 供试品和参考疫苗的 ED₅₀ 均位于最高稀释剂量和最低稀释剂量之间。
- 6.2 统计分析剂量反应关系线性和平行性均无显著差异。
- 6.3 供试品相对评估效力的可信区间位于 25%~400%。
- 6.4 病毒回滴对照和阳性质控血清对照应在规定的范围内。

起草人：江征
复核人：李长贵

肠道病毒 71 型灭活疫苗

简 述

1 简介

肠道病毒 71 型 (Enterovirus 71, EV71) 是导致手足口病 (Hand-foot-mouth disease, HFMD) 的最主要病原体之一。柯萨奇病毒 A16 (Coxsackievirus A16, Cox A16) 以及其他肠道病毒包括 Cox A5、Cox A10 等也可引起该病。HFMD 是婴幼儿中的一种常见疾病, 以发热和手、足、口腔等部位的皮疹或疱疹为主要特征, 大多数患者症状轻微, 不需要特殊的医疗干预; 但少数患者可出现无菌性脑膜炎、脑干脑炎、脊髓灰质炎样麻痹、呼吸道感染和心肌炎等多种重症疾病, 重症患者病程进展迅速, 可导致患儿神经系统发育迟缓和认知功能减退, 致残及病死率高, 愈后差。多项研究显示, 80% 以上重症 HFMD 由 EV71 引起, 因此, EV71 疫苗的上市和应用对重症 HFMD 的防控具有关键意义。

我国于 1981 年上海首次报道本病, 1995 年在武汉分离出第一株 EV71 病毒。近年来, 我国多个地区均有较大规模流行, 2008 年 5 月至 2017 年底, 共报告 HFMD 18183889 例, 其中死亡 3632 例, 发病和死亡人数均为我国丙类传染病之首, 已成为严重威胁我国婴幼儿健康的严重公共卫生问题。

疫苗是防控传染性疾病最有效的手段。为应对我国严重的 HFMD 流行情况, 在国家政府的高度重视下, 我国自主研发的 EV71 全病毒灭活疫苗经 3 万余婴幼儿的临床试验, 首次证实了 EV71 疫苗安全性良好, 对 EV71 所致 HFMD 保护效果均达 90% 以上。于 2015 年 12 月先后获批上市。目前上市的 EV71 疫苗分别为 EV71 灭活疫苗 (人二倍体细胞) 和 EV71 灭活疫苗 (Vero 细胞), 系用肠道病毒 71 型接种细胞, 经培养、收获病毒液、浓缩、纯化和灭活病毒后, 氢氧化铝吸附制成。主要成分为灭活的 EV71 病毒。规格为每瓶 (支) 0.5ml, 含肠道病毒 71 型灭活疫苗中和抗体效价不低于 3.0EU (EU 代表中和抗体效价单位)。接种人群为 6 月龄以上的 EV71 易感者。基础免疫程序为 2 剂次, 间隔 1 个月。每次接种剂量为 0.5ml。

2 质量控制

2.1 质量标准 肠道病毒 71 型灭活疫苗的质量控制包括: 鉴别试验、外观、装量、pH 值、铝含量、抗原含量、效力试验 (ED₅₀ 测定和中和抗体效价测定)、无菌检查、异常毒性检查、抗生素残留和渗透压摩尔浓度。

2.2 标准物质 标准物质是疫苗的质量控制和评价的核心基础。目前已经建立的 EV71 疫苗标准品包括: EV71 疫苗抗原定量国家标准品、中和抗体定量国家标准品和疫苗效力国家参考品。系列国家标准品的研制, 为 EV71 疫苗的全面质量控制提供了客观标尺。2015 年, 中检院又联合 NIBSC 研制成功了第一代 WHO EV71 中和抗体国际标准品, 近期正在开展 WHO EV71 疫苗抗原国际标准品的研制。各生产企业也在国际及国家标准物质的基础上, 先后研究

建立了相关企业标准物质，并已用于保障 EV71 疫苗生产和质控的一致性。

鉴别试验

1 原理

利用 EV71 病毒与 EV71 抗体具有特异性结合的特点，采用酶联免疫（ELISA）法检测供试品中是否含有特异性 EV71 抗原。

2 材料和设备

2.1 材料 EV71 ELISA 抗原检测试剂、解离液；离心管、移液器、吸头。

2.2 设备 酶标仪、洗板机、恒温水浴箱。

3 操作方法

将供试品采用适宜方法解离。取 96 孔酶标板，在相应孔中分别加入解离后的供试品，同时设空白对照、阳性对照和阴性对照，恒温孵育适宜时间。洗板，加入酶标记 EV71-IgG，恒温孵育适宜时间。洗板，加入显色剂 A 和显色剂 B，避光孵育 10~15 分钟，加终止剂。用酶标仪（波长 492nm 或 492nm/450nm）测定 OD 值。

4 结果判定

阴性对照均值×2.1 作为临界值。以 CD 值大于等于临界值为阳性，小于临界值为阴性；供试品应为阳性，证明其中含有 EV71 抗原。

5 注意事项

供试品解离后，应及时进行检测，不得保存。

起草人：毛群颖 高帆

复核人：梁争论

抗原含量测定法

1 原理

利用 EV71 病毒与 EV71 抗体具有特异性结合的特点，采用酶联免疫（ELISA）法检测供试品中特异性 EV71 的抗原含量。

2 材料和设备

2.1 材料 EV71 ELISA 抗原检测试剂、EV71 抗原国家标准品、解离液；离心管、移液器、吸头。

2.2 设备 酶标仪、洗板机、恒温水浴箱。

3 操作方法

将解离后供试品进行倍比系列稀释，取至少 5 个系列稀释度供试品，分别加入 96 孔酶标板，同时设空白对照、阳性对照和阴性对照，以及系列稀释的 EV71 抗原国家标准品。恒温孵育适宜时间。洗板，加入酶标记 EV71-IgG，恒温孵育适宜时间。洗板，加入显色剂 A 和显色剂 B，避光孵育 10~15 分钟，加终止剂。用酶标仪（波长 492nm 或 492nm/450nm）测定 OD 值。

4 结果计算

依据量反应平行线或以下公式计算抗原含量：

$$V=0.2(T_1+T_2+T_3+T_4+T_5)-0.2(S_1+S_2+S_3+S_4+S_5)$$

$$W=0.1(T_5-T_1+S_5-S_1)+0.05(T_4-T_2+S_4-S_2)$$

$$\text{相对效力}=\lg^{-1}[V/W \times \lg 2]$$

$$\text{抗原含量}=\text{相对效力} \times \text{EV71 抗原国家标准品含量}$$

注：S₁~S₅ 表示系列稀释的标准品 OD×1000；T₁~T₅ 表示供试品 OD×1000。

5 注意事项

供试品解离后，应及时进行检测，不得保存。

起草人：毛群颖 高帆

复核人：梁争论

效力试验（一）-ED₅₀测定法

1 原理

利用 EV71 抗原可诱导免疫后小鼠产生特异性中和抗体，且免疫量与中和抗体应答水平呈正相关的特性。将供试品系列稀释后免疫小鼠，间隔一定时期采血，检测中和抗体，用统计学方法计算出能使 50% 小鼠出现中和抗体阳性反应的免疫剂量。

2 材料和设备

2.1 材料 EV71 国家疫苗参考品、稀释液、细胞培养液（MEM 培养基）、胰蛋白酶、横纹肌肉瘤细胞（RD 细胞）、EV71 检测病毒；无菌离心管、无菌移液器、无菌吸头、一次性注射器、无菌 96 孔细胞培养板、医用酒精棉球。

2.2 实验动物 实验小鼠品系为 BALB/c，6~8 周龄或体重 18~22g，SPF 级，雌性应无孕。应购自于具有《实验动物生产许可证》的生产单位，购入的每批动物均应具有质量合格证。

2.3 设备 生物安全柜、CO₂ 培养箱、显微镜等。

3 操作方法

将供试品与 EV71 疫苗国家参考品平衡至室温，使用稀释液分别进行 2 倍或 4 倍的系列稀释。取至少 3 个合适的稀释度，每稀释度接种小鼠 10 只，腹腔匀速注射。28 天对小鼠采血

并分离血清，血清 $-18\sim-22^{\circ}\text{C}$ 冻存备用。

采用经典微量细胞病变法（CPE）检测 EV71 中和抗体效价。将小鼠血清放置室温融化后混匀，在生物安全柜内使用 MEM 培养基将血清按 1:8 稀释，放置于水浴锅中 56°C 灭活 30 分钟。随后冷却至室温。将血清从 1:8 开始进行 2 倍系列稀释。稀释后的血清 $50\mu\text{l}$ /孔加入 96 孔细胞培养板中，再加入 100CCID_{50} 的 EV71 病毒等体积混合， CO_2 培养箱中 37°C 中和 2 小时。加入 $1\times 10^5\sim 2\times 10^5$ 个/ml 的 RD 细胞悬液 $100\mu\text{l}$ /孔。 CO_2 培养箱中 35°C 培养至第 7 天时观察细胞病变。

4 结果计算

以抑制 50% 细胞病变的最高稀释度为病毒滴度，当病毒滴度 $\geq 1:8$ 时判定为阳性，病毒滴度 $< 1:8$ 判定为阴性，按 Reed-Muench 法计算 ED_{50} 。

5 注意事项

- 5.1 EV71 病毒的培养温度应为 $35\sim 37^{\circ}\text{C}$ 。
- 5.2 实验时应设 EV71 疫苗国家参考品，只有参考品结果位于允许范围时，试验方可成立。
- 5.3 注射时应注意操作手法，防止样品溢出。

起草人：毛群颖 高帆

复核人：梁争论

效力试验（二）——中和抗体效价测定法

1 原理

利用 EV71 抗原可诱导免疫后小鼠产生特异性中和抗体，且免疫量与中和抗体应答水平呈正相关的特性。将人用剂量供试品免疫小鼠，间隔一定时期采血，检测中和抗体。

2 材料和设备

2.1 材料 EV71 疫苗国家参考品、稀释液、细胞培养液、胰蛋白酶、横纹肌肉瘤细胞（RD 细胞）、EV71 检测病毒；离心管、移液器、吸头、注射器、细胞培养板。

2.2 实验动物 实验小鼠品系为 BALB/c，6~8 周龄或体重 $18\sim 22\text{g}$ ，SPF 级，雌性应无孕。应购自于具有《实验动物生产许可证》的生产单位，购入的每批动物均应具有质量合格证。

2.3 设备 生物安全柜、 CO_2 培养箱、显微镜。

3 操作方法

将人用剂量供试品与 EV71 疫苗国家参考品同时接种小鼠 10 只，腹腔匀速注射。28 天对小鼠采血并分离血清，血清 $-18^{\circ}\text{C}\sim-22^{\circ}\text{C}$ 冻存备用。

采用经典微量细胞病变法（CPE）检测 EV71 中和抗体效价。将小鼠血清放置室温融化后混匀，在生物安全柜内使用 MEM 培养基将血清按 1:8 稀释，放置于水浴锅中 56°C 灭活 30 分钟。随后冷却至室温。将血清从 1:8 开始进行 2 倍系列稀释。稀释后的血清 $50\mu\text{l}$ /孔加入 96 孔细胞培养板

中,再加入100CCID₅₀的EV71病毒等体积混合,CO₂培养箱中37℃中和2小时。加入 $1 \times 10^5 \sim 2 \times 10^5$ 个/ml的RD细胞悬液100μl/孔。CO₂培养箱中35℃培养至第7天时观察细胞病变。

4 结果计算

以抑制50%细胞病变的最高稀释度为病毒滴度。当病毒滴度 $\geq 1:8$ 时判定为阳性,病毒滴度 $< 1:8$ 判定为阴性(在计算时按4计算)。计算疫苗的中和抗体滴度的几何平均数(CMT),以1:8为1EU,将GMT值除以8即得中和抗体效价,单位EU。

5 注意事项

- 5.1 EV71 病毒的培养温度应为35~37℃。
- 5.2 注射时应注意操作手法,防止样品溢出。

起草人:毛群颖 高帆
复核人:梁争论

轮状病毒疫苗

简 述

人轮状病毒(Rotavirus, RV)在世界范围内流行,是导致5岁以下儿童严重腹泻的最主要病原体之一。主要通过粪-口途径进行传播,在大部分国家以寒冷季节为流行季节,临床主要表现为腹泻、呕吐和低热,随之出现水样便或蛋花样便。至今尚无特效药物对轮状病毒胃肠炎进行治疗,只能对症补液缓解症状,所以发展轮状病毒疫苗成为当今世界卫生组织(World Health Organization, WHO)疫苗发展计划中的首要任务之一。

第一代的轮状病毒疫苗主要是动物来源的病毒株,如牛源和猴源。第二代轮状病毒疫苗多是通过基因重配技术研发的,包含不同型别病毒株的基因重配疫苗。

目前国内外上市和正在研发的轮状病毒疫苗的生产工艺各不相同,但是针对该疫苗生产工艺的质量控制原则是一致的。本文主要介绍口服轮状病毒活疫苗的质量标准。该疫苗目前尚未收入《中国药典》2015年版。成品检定项目包括:外观、装量、病毒滴度、鉴别试验、热稳定性试验、抗生素残留量、无菌检查、异常毒性检查。其中外观、装量、抗生素残留量、无菌检查和异常毒性检查属于通用检测方法,而鉴别试验、病毒滴度和热稳定性试验属于特异性检测方法,下面分别进行介绍。

病毒滴度测定法

1 原理

轮状病毒疫苗是减毒活疫苗，所以用于检测病毒滴度的方法主要是细胞培养半数感染量（cell culture infective dose 50%，CCID₅₀）。将病毒按照倍比稀释或梯度稀释后接种细胞（每个稀释度接种4孔或6孔细胞），培养一段时间后观察病毒致细胞病变或死亡的情况。

目前用于培养轮状病毒的细胞主要是猴肾细胞。轮状病毒感染细胞需要外源性蛋白水解酶的参与，病毒VP4外壳蛋白被蛋白水解酶切割成VP5和VP8，病毒通过VP8与细胞膜上的受体结合后，直接转入细胞膜在细胞浆内进行复制、转录、翻译、装配等完成病毒的合成。因此在病毒滴度测定和鉴别试验时都需要事先用胰蛋白酶进行活化处理。

此外，由于轮状病毒感染细胞后病变不典型，用显微镜很难准确地判断细胞致病变效应（CPE），无法准确客观的量化病变比例，所以判断细胞是否病变需要在常规CCID₅₀法的基础上采用其他辅助方法来完成。口服轮状病毒活疫苗是采用轮状病毒抗原检测试剂盒对反复冻融的病毒感染细胞收获液进行阴阳性判断，并用Karber法计算出病毒滴度。该ELISA法为双抗体夹心法，是先将一定量的包被抗体（抗轮状病毒的抗体）吸附固定于96孔聚苯乙烯微孔板表面，加入无关蛋白载体封闭未结合位点，然后加入待检样本，再加入酶标记的第二抗体后用底物显色，用酶标仪读取每孔的吸光度值，再进行计算分析。

2 材料和设备

2.1 材料 检定用猴肾细胞MA104、有血清细胞培养液（含10%胎牛血清、1%Glu和1%双抗的1640培养液）、无血清细胞培养液（含1%Glu和1%双抗的1640培养液）、PBS、消化细胞用0.25%胰蛋白酶、病毒活化用Ⅲ型胰蛋白酶、轮状病毒抗原检测试剂盒、96孔细胞培养板、细胞培养瓶、96孔深孔板、移液管、无菌吸头、无菌离心管、加样槽、废液槽、细胞计数板、细胞计数器、盖玻片、止血钳、剪刀、一次性无菌衣、口罩、帽子和乳胶手套等。

2.2 设备 冰箱、加样枪、电动移液器、CO₂培养箱、水浴锅、振荡器、生物安全柜、生化培养箱、倒置显微镜、洗板机、酶标仪。

3 操作方法

3.1 准备细胞

3.1.1 细胞复苏 在不加任何条件下直接冻存细胞时，细胞内和外环境中的水都会形成冰晶，能导致细胞内发生机械损伤、电解质升高、渗透压改变、脱水、pH改变、蛋白变性等，能引起细胞死亡。如向培养液加入保护剂，可使冰点降低。在缓慢的冻结条件下，能使细胞内水份在冻结前透出细胞。贮存在-130℃以下的低温中能减少冰晶的形成。细胞复苏时速度要快，使之迅速通过细胞最易受损的-5~0℃，细胞仍能生长，活力受损不大。目前常用的保护剂为二甲基亚砜和甘油，它们对细胞无毒性，分子量小，溶解度大，易穿透细胞。

3.1.1.1 细胞实验室进行常规消毒，紫外照射20分钟以上。

3.1.1.2 将培养液、0.25%胰蛋白酶在恒温水浴箱中37℃预热30分钟，备用。准备一个1000ml的烧杯，内装2/3杯37℃的温水。

3.1.1.3 从液氮保存罐中取出冻存管，立即放入37℃温水中，快速摇晃，直至冻存液完全

融化。

3.1.1.4 将细胞悬液移入 15ml 离心管，缓慢加入 4ml 培养液，以 1000 转/分钟的速度离心 5 分钟。

3.1.1.5 弃掉上清，用培养液悬液混悬沉淀细胞，吹打均匀，调整细胞浓度，分装到培养瓶中，放入 37℃ 5%CO₂ 培养箱中培养。

3.1.2 细胞传代 细胞在培养瓶长成致密单层后，已基本饱和，为使细胞能继续生长，同时也将细胞数量扩大，必须进行传代。

3.1.2.1 传代前准备 预热培养用液：把已经配制好的细胞培养液、PBS 液和细胞消化液放入 37℃ 水浴锅内预热。

细胞实验室进行常规消毒，紫外照射 20 分钟以上。

正确摆放使用的细胞瓶等材料：保证足够的操作空间，不仅便于操作而且可减少污染。

取出预热好的培养用液：取出已经预热好的培养用液，用酒精棉球擦拭好后方能放入生物安全柜内。

从培养箱内取出细胞：注意取出细胞时要旋紧瓶盖，用酒精棉球擦拭显微镜的台面，再在镜下观察细胞。

将细胞放入生物安全柜中。

3.1.2.2 胰蛋白酶消化 加入消化液：小心吸出旧培养液，用 PBS 清洗 2 遍，加入适量细胞消化液（0.25% 胰蛋白酶），注意消化液的量以盖住细胞最好，最佳消化温度是 37℃。

显微镜下观察细胞：倒置显微镜下观察消化细胞，若胞质回缩，细胞之间不再连接成片，表明此时细胞消化适度。

吸弃消化液加入培养液：弃去胰蛋白酶液，注意更换吸管，加入细胞培养液。

3.1.2.3 吹打分散细胞 吹打制悬：用移液管将已经消化细胞吹打成细胞悬液。

吸细胞悬液入离心管：将细胞悬液吸入 10ml 离心管中。

3.1.2.4 细胞计数 培养的细胞在一般条件下要求有一定的密度才能生长良好，所以要进行细胞计数。计数结果以每毫升细胞数表示。细胞计数的原理和方法与血细胞计数相同。

用台盼蓝染细胞，死细胞着色，活细胞不着色，从而可以区分死细胞与活细胞。利用细胞内某些酶与特定的试剂发生显色反应，也可测定细胞相对数和相对活力。当待测细胞悬液中细胞均匀分布时，通过测定一定体积悬液中的细胞的数目，即可换算出每毫升细胞悬液中的细胞数目。

取一套血球计数板，将特制的盖玻片盖在血球计数槽上。

制备计数用的细胞悬液：将细胞悬液稀释至合适浓度，用移液器吸取细胞悬液到一离心管中，加入等体积的台盼蓝染液。活细胞不会被染色，加入染液后就可以在显微镜下区别活细胞和死细胞。

将细胞悬液滴入计数板：将待测细胞悬液吹均匀，然后吸取少量悬液沿盖玻片边缘缓缓滴入。要保证盖玻片下充满悬液，注意盖玻片下不要有气泡，也不能让悬液流入旁边槽中。

统计四个大格的细胞数：将血球计数板放于显微镜的低倍镜下观察，并移动计数板，当看到镜中出现计数方格后，数出四角的四个大格（每个大格含有 16 个中格）中没有被染液染上色的细胞数目。

计算计数用细胞悬液的细胞数，按照下面公式计算细胞密度：

$$\text{细胞悬液的细胞数/ml} = (\text{四个大格细胞数}/4) \times 2 \times 10^4$$

式中, 4 是因为计数了 4 个大格的细胞数; 2 是因为细胞悬液和染液进行了 1:1 稀释; 10^4 是因计数板中每一个大格的体积为: $1.0\text{mm} \times 1.0\text{mm} \times 0.1\text{mm} = 0.1\text{mm}^3$ 而 $1\text{ml} = 1000\text{mm}^3$ 。

例如: 四个大格细胞数为 200, 则细胞浓度为 $200/4 \times 2 \times 10^4 = 10^6$ 个/ml。如配制 100ml 浓度为 10^5 个/ml 的细胞悬液, 需要 $100 \times 10^5 / 10^6 = 10\text{ml}$, 即取 10ml 消化后的细胞悬液, 加入 90ml 细胞培养液, 即为工作浓度细胞悬液。细胞悬液与染液比例可适当调整。

3.1.2.5 滴定用细胞悬液和培养用细胞悬液的制备 培养用细胞悬液的制备: 将细胞悬液吸出以合适的数量分装至培养瓶中, 加入适量培养液旋紧瓶盖。在倒置显微镜下观察细胞形态及密度, 做好标记。

病毒接种用 96 孔细胞培养板制备: 取生长密度合适的检定用细胞, 消化成适宜浓度的细胞悬液, 铺 96 孔细胞培养板, 每孔加入 $100\mu\text{l}$ 细胞悬液, 于 5% CO_2 培养箱中 37°C 培养 3 天后使用。

3.1.3 细胞冻存 对于状态良好、代次合适的细胞, 可以利用冻存技术将细胞置于 -196°C 液氮中低温保存, 使细胞暂时脱离生长状态而将其细胞特性保存起来, 这样在需要的时候再复苏细胞用于实验。

将消化好的细胞悬液收集至离心管中, 1000 转/分钟离心 10 分钟, 弃上清液。沉淀加含二甲亚砜的细胞培养液, 计数, 调整至 $5 \times 10^6/\text{ml}$ 左右。将悬液分至冻存管中, 每管 1ml。标记, 写明细胞种类、代次、冻存日期等信息。放入细胞冻存盒置于 -80°C 冰箱中以 $1^\circ\text{C}/\text{min}$ 的速度梯度降温, 过夜后置于液氮中长期保存。

3.2 病毒活化、稀释

3.2.1 实验室进行常规消毒, 紫外照射 20 分钟以上。

3.2.2 将培养液、PBS 等取出在恒温水浴箱中 37°C 预热 30 分钟, 活化病毒用 III 型胰蛋白酶室温解冻备用, 取出供试品 3~5 支/批。

3.2.3 在生物安全柜内打开供试品外包装, 颠倒混匀, 用止血钳揭开封盖, 各取 1ml 放入无菌离心管中, 充分混匀。

3.2.4 再取 1ml 混匀后的供试品, 移入 1.5ml 或 2ml 离心管中, 每管中加入适量 III 型胰蛋白酶至要求的终浓度, 充分混匀, 放入事先预热至 37°C 的水浴锅中活化一定时间。

3.2.5 配制细胞维持液: 100ml 细胞维持液加入适量 III 型胰蛋白酶至要求的终浓度, 用于稀释活化后的供试品。

3.2.6 取出活化后供试品进行 10 倍梯度稀释, 至 10^{-6} 。取出一个 96 孔深孔板放入操作台内, 每一批供试品用 6 个孔, 每孔加入 $900\mu\text{l}$ 细胞维持液, 第一孔加入 $100\mu\text{l}$ 活化好的供试品, 吹打混匀, 与原始浓度相比稀释 10 倍, 该孔为 10^{-1} ; 从第一孔取出 $100\mu\text{l}$ 液体, 加入至第二孔中, 吹打混匀, 与原始浓度相比稀释 100 倍, 该孔为 10^{-2} ; 依法稀释至 10^{-6} 。备用。

3.3 接种病毒

3.3.1 取之前预先铺好细胞的 96 孔板, 弃去细胞培养液, 每孔加入 $100 \sim 150\mu\text{l}$ 无血清细胞培养液, 轻轻转动细胞培养板, 小心溅出液体, 再弃去无血清细胞培养液, 每孔加入 $100 \sim 150\mu\text{l}$ 无血清细胞培养液, 用无血清细胞培养液重复洗涤细胞板 2~3 次, 最后一次弃去液体后在无菌纸上轻轻拍干, 除去细胞孔中的血清, 以避免残留血清对活化用胰蛋白酶的干扰。

3.3.2 在细胞板加入稀释至 $10^{-3} \sim 10^{-6}$ 的供试品, 每个稀释度加入 4 孔, 每孔 $100\mu\text{l}$, 同时设加入 2 孔细胞维持液作为细胞对照孔。放入湿盒中, 细胞板叠放尽量不超过 3 层, 于 5% CO_2 培养箱中 37°C 培养一定天数。

3.4 显微镜观察 培养期末用光学倒置显微镜观察 3.3.2 中的细胞感染板上的细胞形态，然后在 -20°C 冰箱中冻融 2 次，待测。

3.5 ELISA 检测 将 3.4 中细胞感染板中的收获液按 ELISA 检测试剂盒说明书检测再次确证细胞病变情况。

3.5.1 试剂盒和样本检测前应平衡至室温，平衡后的样本放置时间不超过 30 分钟。

3.5.2 配液：将酶标洗液用蒸馏水 20 倍稀释备用。

3.5.3 编号：将样本对反应板按序编号，同时设立阴性对照 3 孔，阳性对照 2 孔，空白对照 1 孔。

3.5.4 加样：分别在相应孔内加入样本和阴阳性对照各 $50\mu\text{l}$ 。

3.5.5 温育：用封板膜封板后，放置 37°C 温育 60 分钟。

3.5.6 洗板：揭去封板膜，用洗板机洗涤 5 遍，每孔 $300\mu\text{l}$ 洗液。最后一次尽量拍干。

3.5.7 加酶：每孔加入酶结合物 $50\mu\text{l}$ ，空白孔除外。

3.5.8 温育：用封板膜封板后，放置 37°C 温育 60 分钟。

3.5.9 洗板：揭去封板膜，用洗板机洗涤 5 遍，每孔 $300\mu\text{l}$ 洗液。最后一次尽量拍干。

3.5.10 显色：每孔先加入 $50\mu\text{l}$ 底物 A，再加入 $50\mu\text{l}$ 底物 B，充分混匀， 37°C 避光温育 10 分钟。

3.5.11 测定：每孔加入 $50\mu\text{l}$ 终止液，充分混匀，用空白对照孔调零，于 450nm 测定各孔 A 值。

4 结果判定

试验成立条件：阳性对照平均值应大于等于临界值，阴性对照应小于临界值，细胞对照应小于临界值。临界计算公式 = 阴性平均值 $\times 2.1$ （如果阴性平均值小于 0.05，按 0.05 计算）。

根据 Karber 法计算病毒滴度。病毒滴度为 $5.5\sim 7.0\text{lgCCID}_{50}/\text{ml}$ ，判为合格。Karber 法计算公式： $\text{lgCCID}_{50} = X_m - 1/2d + d \cdot \Sigma P_i / 100$ ，其中 X_m = 病毒最高浓度稀释倍数的对数， d = 稀释度系数（倍数）的对数， ΣP_i = 每个稀释度病变百分数的总和。

5 注意事项

5.1 细胞复苏：取细胞的过程中注意带好防冻手套、护目镜。此项尤为重要，细胞冻存管可能漏入液氮，解冻时冻存管中的气温急剧上升，可导致爆炸。在常温下，二甲基亚砜对细胞的毒副作用较大，因此，必须在 1~2 分钟内使冻存液完全融化。如果复苏温度太慢，会造成细胞的损伤。离心前须加入少量培养液。细胞解冻后二甲基亚砜浓度较高，注意加入少量培养液可稀释其浓度，以减少对细胞的损伤。

5.2 细胞消化：严格的无菌操作。适度消化：消化的时间受消化液的种类、配制时间、加入培养瓶中的量等诸多因素的影响，消化过程中应该注意培养细胞形态的变化，一旦胞质回缩，连接变松散，或有成片浮起的迹象就要立即终止消化。

5.3 细胞计数：细胞计数的原则是只计数完整的细胞，若细胞聚集成团时，只按照一个细胞计算。如果细胞压在格线上时，则只计上线，不计下线，只计右线，不计左线。操作时，注意盖片下不能有气泡，也不能让悬液流入旁边槽中，否则要重新计数。

5.4 细胞冻存：操作时应小心，以免液氮冻伤。液氮定期检查，随时补充。

5.5 病毒接种：全程注意无菌操作，穿好一次性无菌反穿衣、帽子和口罩、手套等。生物安全柜紫外无菌照射结束时打开风机循环至少 10 分钟，将产生的臭氧循环掉。病毒稀释时，注意每个稀释度都要更换吸头。

5.6 ELISA 操作：所有样本、废液和废弃物应按照传染物处理。使用前试剂应摇匀，并弃去 1~2 滴试剂后垂直滴加或用加样枪准确加入。洗液若出现结晶，可置于 37℃ 使之溶解。从冷藏环境中取出的试剂盒应置室温平衡 30 分钟后方可使用。终止后须在 10 分钟内完成读数。洗涤液配制必须准确，洗涤必须充分。不同批号的试剂不可混用。

起草人：刘艳 高加梅 杜加亮

复核人：国泰

鉴别试验

1 原理

轮状病毒疫苗是减毒活疫苗，需要先在细胞上进行培养。用于轮状病毒鉴别试验的方法主要是 CCID₅₀ (cell culture infective dose 50%) 的基础上辅以 ELISA 方法进行检测。

将稀释至一定浓度的轮状病毒与适当稀释的轮状病毒特异性免疫血清等量混合，置 37℃ 中和一定时间，接种适应细胞，于 37℃ 培养一定天数判定结果。轮状病毒应完全被中和（无任何细胞病变）；同时设立血清和细胞对照，均应为阴性；病毒对照的病毒滴度应出现细胞病变。

2 材料和设备

2.1 材料 猴肾细胞 MA104、有血清细胞培养液（含 10% 胎牛血清、1% Glu 和 1% 双抗的 1640 培养液）、无血清细胞培养液（含 1% Glu 和 1% 双抗的 1640 培养液）、PBS、抗轮状病毒血清（抗血清）、消化细胞用 0.25% 胰蛋白酶、病毒活化用 III 型胰蛋白酶、轮状病毒抗原检测试剂盒、96 孔细胞培养板、细胞培养瓶、96 孔深孔板、移液管、无菌吸头、无菌离心管、加样槽、废液槽、细胞计数板、细胞计数器、盖玻片、止血钳、剪刀、一次性无菌衣、口罩、帽子和乳胶手套等。

2.2 设备 冰箱、加样枪、电动移液器、CO₂ 培养箱、水浴锅、涡旋振荡器、生物安全柜、生化培养箱、倒置显微镜、洗板机、酶标仪。

3 操作方法

3.1 准备细胞：同病毒滴度试验 3.1。

3.2 病毒活化、稀释

3.2.1 实验室进行常规消毒，紫外照射 20 分钟以上。

3.2.2 将培养液、PBS 等取出在恒温水浴箱中 37℃ 预热 30 分钟，活化病毒用 III 胰蛋白酶室温解冻备用，取出供试品 3~5 支/批。

3.2.3 在生物安全柜内打开供试品外包装，颠倒混匀，用止血钳揭开封盖，各取 1ml 放入无菌离心管中，充分混匀。

3.2.4 再取 1ml 混匀后的供试品，移入 1.5ml 或 2ml 离心管中，每管中加入适量 III 型胰蛋

白酶至要求的终浓度，充分混匀，放入事先预热至 37℃ 的水浴锅中活化一定时间。

3.2.5 配制细胞维持液：100ml 细胞维持液加入适量Ⅲ型胰蛋白酶至要求的终浓度，用于稀释活化后的供试品。

3.2.6 取出活化后供试品进行 10 倍梯度稀释至适宜的滴度，如 10^{-3} 。打开 96 孔深孔板包装，放入操作台内，每一批供试品用 3 个孔，每孔加入 900 μ l 细胞维持液，第一孔加入 100 μ l 活化好的样品，吹打混匀，与原始浓度相比稀释 10 倍，该孔为 10^{-1} ；从第一孔取出 100 μ l 液体，加入至第二孔中，吹打混匀，供试品与原始浓度相比稀释 100 倍，该孔为 10^{-2} ；从第二孔取出 100 μ l 液体，加入至第三孔中，吹打混匀，供试品与原始浓度相比稀释 1000 倍，该孔为 10^{-3} 。备用。

3.3 中和病毒和接种病毒

3.3.1 抗体工作液制备：将抗血清用细胞维持液稀释至一定浓度，备用。

3.3.2 中和病毒：取 500 μ l 步骤 3.2.6 中处理后的供试品分别加入 500 μ l 步骤 3.3.1 中的抗体工作液，混匀，于 37℃ 中和一定时间。

3.3.3 取预先铺好细胞的 96 孔板，弃去有血清细胞培养液，每孔加入 100~150 μ l 无血清细胞培养液，轻轻转动细胞培养板，小心溅出液体，再弃去细胞维持液，每孔加入 100~150 μ l 无血清细胞培养液，用无血清细胞培养液重复洗涤细胞板 2~3 次，最后一次弃去液体后在无菌纸上轻轻拍干，除去细胞孔中的血清，以避免残留血清对活化用胰蛋白酶的干扰。

3.3.4 在细胞板中加入步骤 3.3.2 中的中和后的供试品，每个稀释度加入 4 孔，每孔 100 μ l，同时设加入 2 孔细胞维持液作为细胞对照孔。放入湿盒中，细胞板叠放尽量不超过 3 层，于 5% CO_2 培养箱中 37℃ 培养 6 天。

3.4 显微镜观察 培养期末用光学倒置显微镜观察 3.3.4 中的细胞培养板上的细胞形态，然后在 -20℃ 冰箱中冻融 2 次，待测。

3.5 ELISA 检测 将 3.4 中细胞感染板中的收获液按 ELISA 检测试剂盒说明书检测再次确证细胞病变情况。

3.5.1 试剂盒和样本检测前应平衡至室温，平衡后的样本放置时间不超过 30 分钟。

3.5.2 配液：将酶标洗液用蒸馏水 20 倍稀释备用。

3.5.3 编号：将样本对反应板按序编号，同时设立阴性对照 3 孔，阳性对照 2 孔，空白对照 1 孔。

3.5.4 加样：分别在相应孔内加入样本和阴阳性对照各 50 μ l。

3.5.5 温育：用封板膜封板后，放置 37℃ 温育 60 分钟。

3.5.6 洗板：揭去封板膜，用洗板机洗涤 5 遍，每孔 300 μ l 洗液。最后一次尽量拍干。

3.5.7 加酶：每孔加入酶结合物 50 μ l，空白孔除外。

3.5.8 温育：用封板膜封板后，放置 37℃ 温育 60 分钟。

3.5.9 洗板：揭去封板膜，用洗板机洗涤 5 遍，每孔 300 μ l 洗液。最后一次尽量拍干。

3.5.10 显色：每孔先加入 50 μ l 底物 A，再加入 50 μ l 底物 B，充分混匀，37℃ 避光温育 10 分钟。

3.5.11 测定：每孔加入 50 μ l 终止液，充分混匀，用空白对照孔调零，于 450nm 测定各孔 A 值。

4 结果判定

试验成立条件：阳性对照平均值应大于等于临界值，阴性对照应小于临界值，细胞对照应小于临界值。临界计算公式=阴性平均值 \times 2.1（如果阴性平均值小于0.05，按0.05计算）。

结果判定：大于等于临界值的孔结果判为阳性，小于临界值的孔结果判为阴性。病毒对照孔 ELISA 检测阳性，且病毒中和后的鉴别试验组和其他对照细胞孔 ELISA 检测阴性，判定结果合格。

5 注意事项

同病毒滴度。

起草人：刘艳 高加梅 杜加亮

复核人：国泰

热稳定性试验

热稳定性试验是考察疫苗在热加速条件下病毒滴度的降低情况，其原理、方法及注意事项同病毒滴度测定，要求供试品置于 37℃ 7 天后，病毒滴度下降应不超过 1lg。

起草人：刘艳 高加梅 杜加亮

复核人：国泰

冻干甲型肝炎减毒活疫苗

简 述

1 简介

甲型病毒性肝炎（甲肝）是由甲型肝炎病毒（Hepatitis A virus, HAV）引起的一种急性暴发性传染病。主要以人类、猕猴、人猿等灵长类动物为宿主，以粪-口途径传播。感染者一般表现为畏寒、发热、食欲减退、恶心、疲乏、肝肿大及肝功能异常。甲肝全球流行，每年约有 150 万人感染发病，流行程度与卫生、清洁状况和国家发达程度密切相关。我国曾经为甲肝高流行区，但随着甲肝疫苗的应用和普及，有效控制了我国 HAV 的暴发和流行，使我国的甲肝发病率从 1990 年的 52.6/10 万降为 2006 年的 5.1/10 万，至 2015 年已降至 1.74/10 万，有效控制了甲型肝炎在我国严重流行的局面。

疫苗可有效控制 HAV 的暴发和流行,我国已于 2008 年将甲肝疫苗列入国家免疫规划,极大推动了我国甲肝的防控工作。目前我国上市甲型肝炎疫苗包括甲型肝炎减毒活疫苗和甲型肝炎灭活疫苗两种。冻干甲肝减毒活疫苗的主要活性成分为减毒甲肝病毒,系采用 HAV 减毒病毒株 H2 和 L-A-1 株,经人胚肺二倍体细胞(KMB17 和 2BS 细胞株)作为生产用细胞,经培养、收获、抽提、冻干制成。接种人群为 1 岁半以上的甲肝易感者,全程 1 针免疫。自上市以来,甲肝减毒活疫苗在我国人群中已广泛使用,接种程序简单,价格便宜,具有良好的安全性和有效性。

2 质量控制

2.1 质量标准 甲肝疫苗均实施批签发管理,现行质量标准和检验依据为现行版《中国药典》三部和企业注册标准。

除水分测定外,应按标示量加入所附灭菌注射用水,复溶后进行以下各项检定:鉴别试验、外观、水分、pH 值、渗透压摩尔浓度、三氯甲烷残留量、病毒滴定、热稳定性试验、牛血清白蛋白残留量、抗生素残留量、无菌检查、异常毒性检查和细菌内毒素检查。

2.2 标准物质 第一代甲型肝炎抗体国际标准品(100IU/ml)和甲型肝炎病毒核酸扩增国际标准品(100,000IU/ml,00/560)分别建立于 1981 年和 2003 年。并分别于 1998 年和 2014 年先后建立了第二代甲型肝炎抗体国际标准品(98IU/ml,97/646)和甲型肝炎病毒核酸扩增国际标准品(00/562)用于全球范围甲型肝炎病毒抗体和核酸检测。

鉴别试验

1 原理

利用甲型肝炎病毒与甲型肝炎抗体具有特异性结合的特点,采用酶联免疫(ELISA)法检测供试品中是否含有特异性甲型肝炎抗原。

2 材料和设备

2.1 材料 甲肝抗原 ELISA 检测试剂;离心管、移液器、吸头。

2.2 设备 酶标仪、洗板机、恒温水浴箱。

3 操作方法

3.1 取 96 孔酶标板,在相应孔中分别加入供试品,同时设空白对照、阳性对照、阴性对照,恒温孵育适宜时间。

3.2 洗板,加入酶标记 HAV-IgG,恒温孵育适宜时间。

3.3 洗板,加入显色剂 A 和显色剂 B,避光孵育 10~15 分钟,加终止剂。

3.4 用酶标仪(波长 450nm)测定 OD 值。

4 结果计算

临界值 = 阴性对照均值 \times 2.1 (阴性对照 OD 均值小于 0.05 以 0.05 计)。

5 结果判定

以供试品 \geq 临界值为阳性,证明含有甲肝抗原。

6 注意事项

试验成立条件：阴性对照 OD 均值 <0.1 ，阳性对照 OD 均值 >1.2 时，试验有效。

起草人：毛群颖 卞莲莲

复核人：梁争论

病毒滴度测定法

1 原理

利用活的甲型肝炎病毒可在适宜细胞上生产、增殖的特性，通过细胞接种、增殖、病毒收获和检测，定量供试品中甲肝活病毒的滴度。

2 材料和设备

2.1 材料 MEM 培养液、MEM 维持液、病毒稀释液、胰蛋白酶、甲肝抗原 ELISA 检测试剂、培养用细胞；离心管、移液器、吸头。

2.2 设备 生物安全柜、二氧化碳培养箱、酶标仪、洗板机、恒温水浴箱。

3 操作方法

3.1 将供试品进行系列稀释，选取至少三个连续稀释度的供试品，分别接种至铺单层的适宜细胞上。

3.2 37°C 吸附 2 小时后，补加维持液，置 35°C 恒温培养至病毒增殖高峰。

3.3 收获病毒后用 ELISA 法检测各稀释度供试品的甲肝抗原。

4 结果计算

临界值 = 阴性对照均值 $\times 2.1$ (阴性对照 OD 均值小于 0.05 以 0.05 计)。

5 结果判定

以 \geq 临界值为阳性， $<$ 临界值为阴性；用 Reed-Muench 公式计算供试品的病毒滴定结果 ($\lg\text{CCID}_{50}/\text{ml}$)。

6 注意事项

6.1 由于样本中含有活病毒，全部实验过程应在相应生物安全级别实验室中进行，并符合生物安全相关规定。

6.2 为保证病毒滴度的准确性，应尽量减少样本处理时间，并保持低温。

6.3 试验成立条件：阴性对照 OD 均值 <0.1 ，阳性对照 OD 均值 >1.2 时，试验有效。

起草人：毛群颖 卞莲莲

复核人：梁争论

热稳定性试验

将足量供试品置 37℃ 恒温箱放置 72 小时后，操作方法同病毒滴定测定法。

起草人：毛群颖 卞莲莲

复核人：梁争论

三氯甲烷残留量测定法

1 原理

利用气相色谱可将气化的混合物通过含有某种固定相的色谱柱，基于固定相对不同化合物的保留性能不同而得到分离的技术，定量检测供试品残留的三氯甲烷含量。

2 材料和设备

2.1 材料

2.1.1 标准品溶液配制：精密量取适量的三氯甲烷标准品，置 50ml 量瓶中，加超纯水稀释至刻度，摇匀，配制为 200ng/ml 的标准溶液。以 200ng/ml 的标准溶液为母液梯度稀释，配制 20ng/ml、50ng/ml、100ng/ml、200ng/ml 标准品溶液，精密量取 2ml，置进样瓶中，压盖。

2.1.2 供试品溶液配制：精密量取 1ml 供试品至 250ml 量瓶，准确定容，为 250 倍稀释，精密量取 2ml，置进样瓶中，压盖。

2.1.3 甲醇中三氯甲烷标准品

2.1.4 色谱柱：DB-WAX，125-7037。

2.1.5 顶空进样器

2.1.6 进样瓶

2.1.7 移液管，量瓶，移液器，吸头。

2.2 设备 气相色谱仪。

3 操作方法

3.1 打开高纯氮压缩气体罐，观察总压力表压力应大于 3MPa，分流压力表应在 0.4MPa~0.6MPa 之间。打开气相色谱仪色谱柱室，安装毛细管色谱柱。色谱柱进口端应连接后进样口，色谱柱出口端应连接电子捕获检测器（ECD）。

3.2 顶空进样器参数设置 温度：瓶 40℃、进样环 50℃、进样口 60℃。时间：气相色谱循环时间 15 分钟、顶空进样器平衡时间 25 分钟，顶空瓶加压时间 0.20 分钟、定量环定量时间 0.20 分钟、定量环平衡时间 0.05 分钟、进样时间 1.00 分钟。

3.3 分析方法参数设置 开启气相色谱仪和 workstation 设置参数。后进样口：加热器（150℃）、压力（1.4353psi）、隔垫吹扫流量（3ml/min）、隔垫吹扫流量模式（标准）；载气节省打开 20ml/min，开始等待时间 2 分钟；模式：不分流；分流出口吹扫流量 15ml/min。色谱柱：选择流速控制模式，流速 1.8ml/min。柱箱：初始值温度 70℃，保持时间 13 分钟、升阶 1 速率 50℃/min 升温至 200℃，保持时间 2 分钟；后检测器：电子捕获检测器，尾吹流量 60ml/min，数据采集频率 20Hz。

3.4 进样 将标准品溶液和供试品溶液放置于顶空进样器中，编辑序列行数与顺序，输入

样品名称、类型等信息，保存后运行序列，记录色谱图。

4 结果计算

按外标法以峰面积计算供试品中三氯甲烷的含量。

5 注意事项

回归方程的相关系数 R^2 应不小于 0.99，试验方可成立。

起草人：毛群颖 卞莲莲

复核人：梁争论

甲型肝炎灭活疫苗

简 述

1 简介

甲肝灭活疫苗是采用甲醛灭活的全病毒灭活、纯化疫苗，主要活性成分为 HAV 抗原，以氢氧化铝、磷酸铝或者流感血凝素作为佐剂的液体疫苗，可加入 2-苯氧乙醇作为防腐剂。国内外均有上市，使用覆盖面广、临床研究多，所获资料丰富，疫苗稳定性好。我国生产的甲肝灭活疫苗于 2002 年批准上市，目前有 2 个企业生产，年产量约为 1000 万支。接种人群为 1 岁以上的甲肝易感者，16 岁及以上用成人剂量，1~15 岁用儿童剂量。初次免疫接种 1 剂疫苗，间隔 6 个月加强免疫 1 剂疫苗。

2 质量控制

2.1 质量标准 甲型肝炎灭活疫苗质量标准和检验依据为现行版《中国药典》三部和企业注册标准。

甲型肝炎灭活疫苗的质量控制包括：鉴别试验、外观、装量、pH 值、渗透压摩尔浓度、铝含量、游离甲醛含量、三氯甲烷残留量、2-苯氧乙醇含量、体外相对效力测定、抗生素残留量、无菌检查、细菌内毒素检查和异常毒性检查。

2.2 标准物质 第一代甲型肝炎灭活疫苗抗原国际标准品（WHO IS, 95/500）于 1999 年建立。2010 年，欧洲建立了可溯源至国际标准品的无吸附甲型肝炎灭活疫苗工作标准品。在 2015 年我国也建立了甲型肝炎疫苗抗原国家标准品（2015 国生标字 0030）。然而，目前企业疫苗标准物质仍有待完善。

鉴别试验

同冻干甲型肝炎减毒活疫苗鉴别试验。

起草人：毛群颖 高帆

复核人：梁争论

体外相对效力检查法

1 原理

利用甲型肝炎病毒与甲型肝炎抗体具有特异性结合的特点，采用酶联免疫（ELISA）法检测供试品中特异性甲型肝炎抗原的相对含量。

2 材料和设备

2.1 材料 甲肝抗原 ELISA 检测试剂、甲肝疫苗抗原国家标准品（以下简称标准品）；离心管、移液器、吸头。

2.2 设备 酶标仪、洗板机、恒温水浴箱。

3 操作方法

将供试品与标准品同时解离后，分别进行倍比系列稀释，取至少 5 个系列稀释度，分别加入 96 孔酶标板，同时设空白对照、阳性对照和阴性对照，恒温孵育适宜时间。洗板，加入酶标记 HAV-IgG，恒温孵育适宜时间。洗板，加入显色剂 A 和显色剂 B，避光孵育 10~15 分钟，加终止剂。用酶标仪（波长 492nm 或 492nm/450nm）测定 OD 值。

4 结果计算

依据公式计算相对效力

$$V=0.2(T_1+T_2+T_3+T_4+T_5)-0.2(S_1+S_2+S_3+S_4+S_5)$$

$$W=0.1(T_5-T_1+S_5-S_1)+0.05(T_4-T_2+S_4-S_2)$$

$$\text{相对效力}=\lg^{-1}[V/W*\lg 2]$$

注：S₁~S₅表示系列稀释的标准品 OD*1000；T₁~T₅表示供试品 OD*1000。

5 注意事项

5.1 供试品解离后，应及时进行检测，不得保存。

5.2 试验成立条件：阴性对照 OD 均值 < 0.1，阳性对照 OD 均值 > 1.2 时，试验有效。

起草人：毛群颖 高帆

复核人：梁争论

三氯甲烷残留量测定法

同冻干甲型肝炎减毒活疫苗三氯甲烷残留量测定法。

起草人：毛群颖 高帆

复核人：梁争论

2-苯氧乙醇含量测定法

1 原理

反相色谱（RPC）是指利用非极性的反相介质为固定相，极性有机溶剂的水溶液为流动相，根据溶质极性（疏水性）的差别进行溶质分离与纯化的洗脱色谱法。溶质在反相介质上的分配系数取决于溶质的疏水性，一般疏水性越大，分配系数越大。

2 材料和设备

2.1 材料 C18 反相色谱柱（十八烷基硅烷键合硅胶填充剂）、量瓶、量筒、玻璃瓶、移液管、2-苯氧乙醇标准品。

2.2 设备 高效液相色谱仪（紫外检测器 UV-270nm）、低速离心机。

2.3 溶液配制

2.3.1 流动相（CH₃CN - H₂O）：精确量取 500ml 乙腈（色谱纯），加超纯水至 1000ml。置于玻璃瓶中，室温保存，有效期 1 个月。

2.3.2 2-苯氧乙醇对照品贮备液：精确量取 2-苯氧乙醇溶液 50μl，加超纯水定容至 50ml，制备成 2-苯氧乙醇对照品贮备液（5μl/ml）。置于玻璃瓶中，临用现配。

3 操作方法

3.1 对照品溶液的制备 精确量取 2-苯氧乙醇对照品贮备液（5μl/ml）1.0ml 至量瓶中，用乙腈定容至 10ml，0.45μm 滤膜过滤后即为对照品溶液。

3.2 供试品溶液的制备 取一定体积供试品，3000 转/分钟离心 10 分钟，精确量取上清 1.0ml，用乙腈定容至 10ml，0.45μm 滤膜过滤后即为供试品溶液。

3.3 试验条件 流速：1.0ml/min、上样量：对照品溶液、供试品溶液及样品均为 10μl。柱温：40℃。紫外检测波长：270nm。

4 结果计算

按公式计算供试品 2-苯氧乙醇含量：

$$2\text{-苯氧乙醇含量}(\mu\text{l/ml}) = (\text{供试品峰面积}/\text{对照品峰面积}) \times \text{供试品稀释倍数} \times \text{对照品浓度}(\mu\text{l/ml})$$

起草人：马霄 毛群颖 高帆

复核人：梁争论

重组乙型肝炎疫苗

简 述

继第一代血源性乙型肝炎（简称乙肝）疫苗停止使用之后，全世界使用的均为重组乙肝疫苗，系由重组酵母或哺乳动物细胞表达的乙肝病毒表面抗原（HBsAg）经色谱柱、过滤等多步骤纯化后，加入铝佐剂配制而成。接种乙肝疫苗后，可刺激机体产生抗乙肝病毒的免疫力，用于预防乙肝和丁型肝炎。

我国的乙肝疫苗是计划免疫，国产乙肝疫苗、尤其是首针及时接种率及全程接种完成率为我国控制乙肝流行做出了重要贡献，针对我国乙肝流行状况规定新生儿一般在出生后 24 小时内接种第一针疫苗，对 HBsAg 阳性母亲进行筛查、对其所生新生儿接种疫苗的同时还注射乙肝免疫球蛋白（HBIG），提高了阻断 HBV 传播的效果，尤其是母婴传播。

乙肝疫苗只有注射剂一种剂型。目前我国上市的乙肝疫苗有四种规格，分别为 10 μ g/0.5ml、20 μ g/0.5ml、20 μ g/1.0ml、60 μ g/1.0ml。包装形式有 3 种，即安瓿瓶、西林瓶和预灌封注射器。

目前全球已有 10 亿剂以上的乙肝疫苗应用于新生儿、儿童、青少年和成人人群，大量的研究均表明其具有较好的安全性。我国乙肝疫苗除每年用于约 2 千万新生儿计划免疫外，还用于青少年、成人的加强免疫；从 2008 年起，我国每年乙肝疫苗批签发量约 8000 万至 1 亿剂。

乙肝疫苗检定应依据现行版《中国药典》或其他国家药品标准进行，并应符合相关要求。

乙肝疫苗的检定内容按照生产阶段分为生产用菌种（细胞）、原液、半成品、成品的检定。生产用菌种细胞的主种子批及工作种子批均应进行检定，主要包括培养物纯度、HBsAg 基因序列测定、活菌率、抗原表达率、质粒保有率/ HBsAg 基因拷贝数及基因整合稳定性；生产用细胞的主细胞库和工作细胞库检定应符合“生物制品生产检定用动物细胞基质制备及检定规程”规定，并进行细胞外源因子检查、细胞鉴别试验、HBsAg 表达量等检定。原液检定主要包括无菌检查、蛋白质含量、纯度、细菌内毒素、宿主细胞 DNA 残留量、宿主细胞蛋白质残留量、N 端 15 个氨基酸序列测定等；半成品检定主要包括无菌检查、细菌内毒素检查、吸附完全性等；成品检定按照检验类别一般分为有效性检测项目（鉴别试验、体外相对效力测定/效价测定）、安全性检测项目（细菌内毒素、无菌检查、异常毒性检查）等，物理检查项目主要包括外观、装量、渗透压摩尔浓度；化学检定项目主要包括 pH 值、铝含量，以及依据三个品种乙肝疫苗生产工艺的不同，对于一些其他辅料例如硫氰酸盐、Triton X-100、聚山梨酯 20、游离甲醛、聚乙二醇等在原液、半成品或成品过程中进行残留量控制。目前我国乙肝疫苗的质量控制水平及要求与国际标准基本一致，部分项目要求高于国外。

我国重组乙肝疫苗有酿酒酵母、汉逊酵母和 CHO 细胞 3 种表达系统，不同系统表达的 HBsAg 糖基化程度、单克隆抗体表位等抗原特性存在不同，其诱导的细胞免疫和体液免疫反应也各具特点。为保障国产乙肝疫苗的有效性，我国已建立上述三种乙肝疫苗效力参考品，有力

的保证了产品的质量一致性。

乙肝疫苗特异性检验方法如下。

鉴别试验

1 原理

本实验的目的是证明乙肝疫苗中含有 HBsAg。乙肝疫苗含有铝佐剂，未吸附的乙肝表面抗原（HBsAg）量很低，因而一般需要解离后进行 HBsAg 的检测，采用酶联免疫法或其他适宜的免疫方法进行鉴别试验，原理为 HBsAg 特异性抗体与疫苗中 HBsAg 结合，通过酶联反应或其他化学反应（如化学发光等）结果证明含有 HBsAg。

2 材料和设备

2.1 材料和试剂 乙肝表面抗原检测试剂（酶联免疫法或其他适宜方法）、解离液（含 2.5% 二乙醇胺、0.2% TritonX-100 的 PBS 溶液 [pH 7.2]）；加样器等。

2.2 设备 37℃ 水浴箱、酶标仪、洗板机。

3 操作方法

3.1 供试品处理 每批供试品取 5 支，每支取 100 μ l，分别加入 100 μ l 样品解离液混匀，置 20~28℃，解离 30 分钟。

3.2 供试品检测 按照检测试剂盒说明书进行操作，每支处理后的供试品均需复孔测定，反应结束后使用酶标仪或其他检测仪器测定结果。

4 结果判定

按照检测试剂说明书计算临界值，供试品测定值大于等于临界值判为阳性，证明含有 HBsAg。

5 注意事项

乙肝疫苗为含铝佐剂制品，易因放置、沉淀而分层，取样时注意摇匀。

试验中严格按照检测试剂说明书及注意事项进行。

起草人：邱少辉 何鹏

复核人：胡忠玉

体外相对效力检查法

1 原理

乙肝疫苗的效力评价开始都是通过小鼠效力进行检测。我国酿酒酵母重组乙肝疫苗系由 Merck 公司转让，Merck 在重组乙肝疫苗中最早开展体外相对效力检测方法研究，经过多批数据积累证明体外相对效力与体内小鼠效力之间存在关联性，因而在乙肝疫苗效力检测中用体外相对效力代替了小鼠效力。由于乙肝疫苗含有铝佐剂，不进行解离很难检测疫苗中全部 HBsAg

含量,同时参考品的稳定性、检测方法的稳健性也是制约体外相对效力的关键因素。我国 CHO 细胞重组乙型肝炎疫苗由于至今没有找到适宜的解离条件,现仍沿用小鼠体内效力测定方法。

体外相对效力测定系指利用参考品,应用生物学手段检测疫苗中特异性抗原含量或相对于参考品的比值。

对重组乙型肝炎疫苗(酿酒酵母/汉逊酵母)及其参考品在适宜条件下进行解离,按照一定的比例进行系列稀释,使供试品及参考品在等剂量条件下,采用酶联免疫法或其他适宜方法测定供试品中 HBsAg 含量,并以参考品为标准,采用双平行线测定法计算疫苗供试品的相对效力。

2 材料和设备

2.1 材料和试剂 乙肝表面抗原诊断试剂(酶联免疫法或其他适宜方法)、灭菌注射用水、解离液(含 2.5%二乙醇胺、0.2% TritonX-100 的 PBS 溶液)、样品稀释液(含 1% BSA 的 PBS 溶液)、重组(酵母)乙型肝炎疫苗冻干参考品;加样器等。

2.2 设备 酶标仪或其他方法对应检测仪器、水浴箱、洗板机。

3 操作方法

3.1 样品处理 每批供试品取 3 支混合后取 100 μ l;参考品加入 0.5ml 灭菌注射用水复溶,静置 20 分钟后混匀取 100 μ l。取出的 100 μ l 供试品及参考品分别加入 100 μ l 解离液,混匀后置 20~28 $^{\circ}$ C,解离 30~35 分钟(个别厂家采用解离 90 分钟)。如处理后参考品、供试品浓度不一致,取一定量的供试品稀释液将两者调至相同浓度。之后分别以供试品处理液进行适当稀释,稀释后取 1:2000、1:4000、1:8000、1:16000、1:32000 或其他适宜的稀释度进行测定,稀释度不应少于 4 个,每个稀释度平行双份测定。

3.2 样品检测 采用酶联免疫法检测试剂测定时,按照检测试剂说明书进行操作,阴性和阳性对照的吸光度均值应在检测试剂要求范围内,试验方有效。使用其他方法测定时,也需要按检测试剂说明书进行操作并按要求进行试剂校准和质控。

4 结果计算及判定

进行 3 次测定获得的数据均用量反应平行线测定法计算相对效力,以 3 次相对效力的几何均值为其体外相对效力。以参考品为标准,供试品相对效力应不小于 0.5(酿酒酵母)或 1.0(汉逊酵母),方可判为合格。

5 注意事项

5.1 注意参考品及其复溶液应放置室温平衡充分。

5.2 铝佐剂疫苗取样的均匀性。

5.3 体外相对效力检测需要稳定的参考品和稳健的检测方法。

5.4 含铝佐剂疫苗进行体外相对效力试验时应关注铝佐剂对抗原的影响,即是否需要解离,解离条件、参考品、检测试剂盒是否满足检测要求。

5.5 含铝佐剂疫苗建立体外相对效力试验检测时需关注体内效力结果与体外相对效力之间的关联性。

5.6 尽可能使用与供试品的含量相近的参考品,因测定时供试品与参考品使用相同稀释

度，如在同一稀释度条件下含量差别较大，含量测定时不在最佳线性范围内，将影响测定结果的准确性和重复性。

起草人：邱少辉 何鹏

复核人：胡忠玉

效价测定法

1 原理

本实验是采用动物法对疫苗效力进行测定，将系列稀释的重组乙型肝炎疫苗免疫小鼠后，由于乙肝疫苗中 HBsAg 刺激小鼠机体产生特异性乙肝表面抗体（抗-HBs），采用酶联免疫法或其他适宜方法测定免疫小鼠血清中抗-HBs 水平，即能反映疫苗的免疫原性和保护效果，统计各稀释度抗体阳转小鼠数，使用 Reed-Muench 法计算 ED_{50} 或与参考品相比的 ED_{50} （稀释度）比值，即可不使用参考品直接计算结果，如 Merck 乙肝疫苗最初 ED_{50} 采用不高于 $1.5\mu\text{g}$ 的标准，但目前我国 CHO 细胞乙肝疫苗采用与参考品 ED_{50} （稀释度）比值测定效价。

2 材料和设备

2.1 动物 SPF 级 4~5 周龄未孕雌性 NIH 或 BALB/c 小鼠。

2.2 材料和试剂 乙肝表面抗体检测试剂、与供试品来源一致的铝佐剂、重组乙型肝炎疫苗参考品；加样器等。

2.3 设备 酶标仪或其他方法对应检测仪器、水浴箱、洗板机。

3 操作方法

3.1 供试品及参考品稀释 参考品加入 0.5ml 灭菌注射用水复溶，静置 20 分钟后混匀，使用铝佐剂将参考品和供试品进行连续稀释，选取适宜浓度的稀释后参考品和供试品免疫小鼠。

3.2 动物免疫 动物免疫采用腹腔注射方式，首先左手抓取小鼠后，用左手拇指、食指捏住小鼠颈背部皮肤，用无名指及小指固定尾部，翻转使腹部向上，使用医用酒精棉球擦拭腹部，待酒精挥发干后，在下腹部腹白线左侧约 5mm 处以 30° 将针头刺入，沿皮下向前平行穿刺约 3~5mm 后，再刺入腹腔，轻轻回抽，确认没有血液或肠内容物后，注入稀释后的参考品或疫苗供试品溶液。注射完毕后，缓慢拔出针头，防止溶液外漏。每个稀释度接种小鼠 20 只，每只腹腔注射 1.0ml，4~6 周后采血，分离血清备用。

3.3 抗-HBs 检测 使用酶联免疫法或其他适宜方法的乙肝表面抗体检测试剂盒测定小鼠血清中抗-HBs 水平，按照检测试剂说明书计算临界值，血清抗-HBs 测定值大于等于临界值判为抗体阳性。

4 结果计算

将不同稀释度血清抗体测定结果记入下表中，采用 Reed-Muench 法分别计算参考品和供试品的 ED_{50} （稀释度），表格及公式如下：

稀释倍数	稀释对数	抗体阳性	抗体阴性	阳性累计	阴性累计	阳转比例	百分率(%)

$$\text{距离比例} = \frac{\text{高于50\%阳转率(最低浓度)} - 50}{\text{高于50\%阳转率(最低浓度)} - \text{低于50\%阳转率(最高浓度)}}$$

50%阳转终点对数 = 高于50%阳转率稀释对数(最低浓度) + 距离比例 × 稀释对数的因数

$$\text{ED}_{50}(\text{稀释度}) = 10^{\text{50\%阳转终点对数}}$$

5 结果判定

供试品 ED_{50} (稀释度) / 参考品 ED_{50} (稀释度) 之值不低于 1.0, 判为合格。

6 注意事项

- 6.1 不同稀释度疫苗免疫小鼠的血清抗-HBs 阳转百分率应呈剂量效应关系。
- 6.2 注意效力评价用小鼠遗传背景的一致性。动物应购自于具有《实验动物生产许可证》的生产单位, 购入的每批动物均应具有质量合格证; 动物应饲养在符合要求的屏障环境。
- 6.3 分离的血清如果不立即检测, 应在 -20°C 以下冻存。
- 6.4 参考品及复溶水、铝佐剂均应在室温平衡 30 分钟左右。
- 6.5 稀释以及注射中应关注铝佐剂及疫苗的统一性, 应及时混匀使用, 防止因沉淀、分层造成的不均匀。

起草人: 邱少辉 何鹏

复核人: 胡忠玉

戊型肝炎疫苗

简 述

戊型肝炎是由戊型肝炎病毒 (Hepatitis E virus, HEV) 引起的经肠道传播的急性病毒性肝炎。2015 年 WHO 戊型肝炎全球疾病负担研究数据表明, 每年约 2010 万人 HEV 感染、340 万有症状病例、70000 例死亡和 3000 例死产。一般人群戊型肝炎患病死亡率在 0.1%~4%。健康人感染 HEV 多表现为亚临床症状, 自限性过程, 而在妊娠晚期的妇女中, 死亡率可达 10%~50%。免疫抑制患者及器官移植病人感染 HEV 可长期携带。慢性肝病患者感染 HEV 可引发严重的肝损伤症状。

目前全世界只有一种戊型肝炎疫苗（以下简称戊肝疫苗）上市，我国是迄今唯一生产戊肝疫苗的国家。厦门万泰生物技术有限公司生产的以大肠埃希菌为表达载体的重组戊肝疫苗（商品名为 Hecolin[®]）于 2011 年 12 月批准上市，临床批准使用年龄为 16 岁以上易感染人群。Hecolin[®] 为非自毁型预冲注射器包装，外观为白色悬浊液体，每剂 0.5ml，含 30 μ g 纯化的重组 HEV 抗原，另含氯化钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、0.8mg 氢氧化铝、25 μ g 硫柳汞和注射用水。戊肝疫苗全程免疫剂次为 3 剂，免疫时间为 0、1 和 6 个月，储存温度为 2~8 $^{\circ}$ C，批准保质期为 36 个月。

戊型肝炎疫苗成品检验项目共 12 项，包括外观、装量、无菌试验、成品鉴别试验、铝含量、硫柳汞含量、pH 值、异常毒性、内毒素、渗透压、残余卡那霉素含量检测、效力试验，各项目检测结果应符合国家标准。其中，鉴别试验和效力试验为戊型肝炎疫苗特异性检测项目。应积累企业检测数据和监管机构的检测数据，并通过趋势分析评估多批次疫苗检测指标结果的一致性，根据实验的变异度和精确度确定警戒限和行动限。

戊肝疫苗成品特异性检验方法如下。

鉴别试验

1 原理

疫苗的鉴别试验系指采用免疫学方法证明供试品疫苗中含有特定抗原物质的定性检测方法。根据不同疫苗所含生物活性物质的特点选择不同的免疫学检测方法，现行版《中国药典》中疫苗的鉴别检测包括凝胶免疫沉淀法观察特异沉淀线；体内或体外病毒中和试验法计算 CCID₅₀；酶联免疫等生物学方法。

戊型肝炎疫苗鉴别试验采用双抗体夹心酶联免疫法，将已知特异性戊型肝炎病毒单克隆抗体包被在酶标板上，当加入疫苗抗原后，形成固相抗体-抗原复合物，通过洗涤的方法去除未结合物，然后加入酶标记抗体进行反应，形成固相抗体-抗原-酶标抗体免疫复合物，洗涤除去游离未结合的酶标抗体，最后加入底物显色，当检测结果为阳性时，证明供试品中含有戊型肝炎疫苗抗原。

2 材料和设备

- 2.1 材料 供试品、戊肝疫苗抗原检测试剂。
- 2.2 设备 微量加样枪、酶标仪、洗板机、恒温箱。

3 操作方法

3.1 仔细阅读操作说明书，按说明书检查试剂组分是否齐全。将检测板、样品稀释液、酶稀释液平衡至室温。

3.2 供试品解离：取 1 支供试品，吸取 200 μ l 于 1.5ml 离心管中，按照 1:1 加入疫苗解离液，混匀，37 $^{\circ}$ C 温育 4 个小时后，每分钟 12000 转离心 10 分钟。

3.3 供试品稀释：取供试品离心后的上清液，用样品稀释液分别做 1:10、1:100 和 1:1000 稀释，备用。

3.4 阳性对照的稀释：取出阳性对照 1 支，加入适量注射用水复溶，再用样品稀释液将其稀释至 200ng/ml。

3.5 加样：取检测板，加入阳性对照和供试品，100 μ l/孔，双孔重复；另设两孔样品稀释

液作为阴性对照。

- 3.6 温育、洗板：37℃温育 45 分钟，洗涤 5 次后扣干。
- 3.7 加酶：加入酶标抗体，100μl/孔。
- 3.8 温育、洗板：37℃温育 45 分钟，洗涤 5 次后扣干。
- 3.9 显色：将显色 A 液与显色 B 液 1:1 混匀，100μl/孔，37℃显色 10 分钟。
- 3.10 终止：加入终止液，50μl/孔。
- 3.11 读值：以 620nm 或 630nm 吸光度为背景值，读取 450nm 吸光度值。

4 结果判断

临界值 = 阴性均值 × 2.1 (阴性均值小于 0.05 时，以 0.05 计算)；当阴性对照双孔 OD 值均小于 0.100，该实验有效，否则重复实验。

在阳性对照呈阳性、阴性对照呈阴性的条件下，三个稀释度的供试品只要有 1 个呈阳性即判为符合规定。

5 注意事项

- 5.1 检测用试剂须平衡至室温后使用。
- 5.2 疫苗需按要求充分解离后检测上清样品。

起草人：吴星
复核人：梁争论

效力检查法

1 原理

疫苗效价是反映疫苗质量的关键指标，也是用于考察疫苗稳定性或降解程度的重要指标。对于大多数疫苗，效价指标可反映降解对疫苗的免疫原性和保护效果产生的影响。根据疫苗特性的不同，效价检测方法也各不相同，包括体内效力或体外效力检测方法，应与相应疫苗批签发发放行的效价检测方法一致。

由于体外相对效力检测方法具有准确定量、重复性好和符合 3R 原则等优点，在得到稳定的体内效力和体外效力相关关系后，可采用体外相对效力检测方法代替体内法，如甲肝灭活疫苗和乙肝疫苗；对于肺炎多糖疫苗和结合多糖疫苗，可通过游离糖检测方法准确反映疫苗稳定性。

本法采用系列稀释的疫苗免疫试验小鼠，用间接酶联免疫法检测免疫后 4 周小鼠血清并统计各组抗体阳转小鼠数，用 Reed-Muench 方法计算疫苗效力 (ED₅₀)。

2 材料和设备

2.1 材料

2.1.1 样品

2.1.1.1 戊型肝炎疫苗效力参考品：系将戊型肝炎疫苗原液添加与成品疫苗相同剂量的铝佐剂，并添加适当保护剂，经冻干后制成。首批戊型肝炎疫苗效力国家参考品于 2018 年获批，

编号为 300031；批号为 300031-201801。要求企业及检定机构在戊肝疫苗效力试验过程中，将该参考品作为试验对照与供试品同时检测，该参考品 ED_{50} 应小于 $1.0\mu\text{g}$ 。

2.1.1.2 戊型肝炎疫苗供试品。

2.1.2 试剂 戊型肝炎疫苗效力检测试剂。

2.1.3 实验动物 SPF 级 BALB/c 小鼠，体重 $18\sim 22\text{g}$ ，雌者应未孕。应购自于具有《实验动物生产许可证》的生产单位，购入的每批动物均应具有质量合格证。

2.2 设备 酶标仪、恒温培养箱、自动洗板机、离心机、电子天平。

3 操作方法

3.1 参考品和供试品溶液的制备 将重组戊型肝炎疫苗参考品及供试品从冰箱中取出，于室温放置 $30\sim 35$ 分钟。小心开启冻干参考品瓶盖，用移液枪准确量取 $500\mu\text{l}$ 无菌注射用水加入戊肝疫苗冻干参考品，于室温静置 $30\sim 35$ 分钟使其彻底复溶，混匀后转入小离心管。精确量取供试品和复溶后的参考品适量，用疫苗稀释液等比稀释 $4\sim 6$ 个稀释度，其中某两个相邻的稀释度疫苗免疫小鼠后，抗体阳转率应分别大于和小于 50%。记录稀释日期和时间。

3.2 免疫 将稀释好的参考品和供试品振荡混匀，按组别以注射器抽取 1ml 供试品；取对应组别小鼠，一手握小鼠，用拇指、食指捏小鼠颈背部，用无名指及小指固定其尾和后肢，腹部向上。用酒精棉球擦拭小鼠腹部的注射部位，腹腔匀速注入供试品溶液。注射完毕后，拔出针头，防止药液外漏。将小鼠放入鼠盒内，观察即时反应，记录免疫日期。

3.3 采血 于免疫后 $28\sim 32$ 天采血，采用小鼠眼眶后缘采血或摘眼球取血方式，采集 $200\mu\text{l}$ 全血，置于 1.5ml 已灭菌 EP 管中，以 8000 转/分钟离心 5 分钟，提取血清并做好标记。若未立即分离，应将血液保存于 $2\sim 8^\circ\text{C}$ （存放时间不得超过 20 小时）。分离血清后，24 小时内检测抗体或将血清冻存于 -20°C 备用。记录采血日期。

3.4 抗体检测

3.4.1 将戊肝抗原板、样品稀释液、酶稀释液、戊肝抗体参考品平衡至室温。

3.4.2 小鼠血清供试液制备、加样：将小鼠血清进行 10 倍稀释，取 $10\mu\text{l}$ 加到已预加 $90\mu\text{l}$ 样品稀释液的戊肝抗原板中。

3.4.3 对照稀释、加样：小鼠血清以样品稀释液 10 倍稀释后作为阴性对照，加样 $100\mu\text{l}$ ；将戊肝抗体参考品以样品稀释液稀释后作为阳性对照，加样 $100\mu\text{l}$ ；均做复孔。

3.4.4 温育、洗板： 37°C 温育 1 小时，洗涤 5 次扣干。

3.4.5 加酶：每孔加入 $100\mu\text{l}$ 以酶稀释液按一定比例稀释好的酶标抗体 GAM-HRP。

3.4.6 温育、洗板： 37°C 温育 45 分钟，洗涤 5 次后扣干。

3.4.7 显色：将显色 A 液与显色 B 液 1:1 混匀，每孔加 $100\mu\text{l}$ ， 37°C 显色 10 分钟。

3.4.8 终止：每孔加入 $50\mu\text{l}$ 终止液。

3.4.9 读值：读取 $OD_{450/630\text{nm}}$ 。

4 计算

4.1 临界值：临界值 = 安慰剂组血清 OD 值均值 $\times 2.1$

4.2 结果统计：统计每剂量组抗 HEV 抗体阳性、阴性的小鼠数量。

4.3 ED_{50} 计算（采用 Reed-Muench 法）

指数的小数部分 (ii) = (大于或等于且最接近 50% 的阳性率 - 50%) / (大于或等于

且最接近 50%的阳性率-小于且最接近 50%的阳性率)
指数部分 (I) = 大于或等于且最接近 50%的阳性率所在组的稀释梯度 (i) +
指数的小数部分 (ii)

ED_{50} 所在梯度的稀释倍数 = 相邻梯度的稀释倍数的指数 (I) 次幂

ED_{50} = 免疫的起始浓度/ ED_{50} 所在梯度的稀释倍数

5 试验成立条件

同时检测的戊肝疫苗效力参考品的 ED_{50} 值应在该实验室疫苗效力参考品 ED_{50} 允许值范围内。

6 注意事项

需记录供试品和参考品稀释、小鼠免疫及采血日期。

起草人：吴星

复核人：梁争论

水痘疫苗

概述

水痘是由水痘-带状疱疹病毒 (VZV) 初次感染引起的急性传染病。主要发生于婴幼儿和学龄前儿童，全年均可发生，但冬季和春季是水痘感染的高峰期。90%以上的儿童在青春期前均感染过水痘，成人感染率低于 5%。儿童通常表现为轻症自限性疾病，伴有发热和特征性皮肤疱疹，偶尔会出现严重的并发症。成人发生水痘虽然比较少见，但出现严重并发症的概率明显增加。患者为主要传染源，易感者接触患者后约 90% 发病。

水痘冻干减毒活疫苗和麻疹-腮腺炎-风疹-水痘 (MMRV) 联合疫苗已在很多国家得到广泛应用。2000 年，我国国产冻干水痘减毒活疫苗首次批准上市。冻干水痘减毒活疫苗标准为每剂病毒含量不少于 2000PFU，用于 12 月龄到 12 岁的健康水痘易感者，每一次人用剂量为 0.5ml。我国 MMRV 目前还在研发阶段。

病毒滴定需要用到病毒滴度的参考品，参考品一方面用来验证试验是否成立，另一方面提供了统一的参考标准，利于生产单位和监管部门更好的控制疫苗的质量。目前尚无水痘病毒滴度的国际参考品，WHO 建议各国制定自己的病毒滴定参考品。2006 年，原中国药品生物制品检定所（即现在的中国食品药品检定研究院）制备了我国水痘带状疱疹病毒滴定国家参考品，批准文号为 (2006) 国生参字 006，批号为 991224，滴度为 (4.3 ± 0.5) lgPFU/ml，此参考品一

直沿用至今。

对成品检定项目的设置是依据水痘减毒活疫苗的质量属性，分别对其安全性、有效性、批间一致性和均一性进行控制。疫苗成品检验项目包括鉴别试验、外观、pH 值、渗透压摩尔浓度、水分、病毒滴定、热稳定性试验、牛血清白蛋白残留量、抗生素残留量、无菌检查、异常毒性检查和细菌内毒素含量。其中，外观是对制品质量判断最直观、最快捷的检测方法。鉴别试验确保生产使用毒种的正确性。病毒滴度是疫苗有效性的唯一指标，热稳定性试验是反映疫苗质量一致性检测指标，应与病毒滴度检测同时进行。pH、渗透压、水分是疫苗的理化指标，影响疫苗的稳定性和免疫效果。无菌检查、异常毒性检查和细菌内毒素含量是安全性指标，牛血清白蛋白和抗生素是工艺相关杂质。

鉴别试验

1 原理

《欧洲药典》《英国药典》、WHO 和现行版《中国药典》三部均推荐采用中和法进行水痘病毒的鉴别。中和试验分为体内中和法和体外中和法。水痘减毒活疫苗鉴别试验用的是体外中和法，原理是病毒与特异性抗体结合后失去了感染细胞的活性，导致无细胞病变产生。因此，可用水痘病毒特异性免疫血清先中和水痘病毒后接种细胞，观察细胞病变的发生来鉴定水痘病毒。

2 材料与设备

- 2.1 供试品至少 3 支。
- 2.2 水痘减毒活疫苗滴定参考品：至少 2 支。
- 2.3 抗水痘病毒特异免疫血清：中和效价应 $\geq 1:10$ ，且对细胞无毒性作用。
- 2.4 细胞：人二倍体细胞（MRC-5 或 2BS）。
- 2.5 细胞培养液、病毒稀释液、磷酸盐缓冲液、细胞消化液（0.25%胰酶）。
- 2.6 细胞培养板。
- 2.7 生物安全柜、CO₂ 培养箱、倒置光学显微镜等。

3 操作方法

3.1 细胞制备 选择细胞界限清晰，具有立体感，形态好，已长成片的人二倍体细胞，弃去原培养液，加适量细胞消化液消化细胞，待细胞面出现针尖样小孔或轻摇细胞边缘有脱落时，弃掉消化液，用灭菌吸管吸取数毫升细胞培养液分散细胞，并稀释至约 1×10^5 个/ml 的细胞悬液，接着，将稀释好的细胞悬液接种于 6 孔细胞培养板中，每孔 3ml，置于 37℃、4%~5% CO₂ 培养箱培育 3~4 天后接种样品。

3.2 抗水痘病毒免疫血清制备 取抗水痘病毒免疫血清，根据其中和效价，用疫苗稀释液稀释至 10 或 20 个中和单位备用。

3.3 供试品稀释 于无菌小管中进行疫苗稀释。取供试品 3 支，每支按制品内包装上的标示量加灭菌注射用水溶解后进行混合。用疫苗稀释液将供试品稀释至 ≥ 1000 PFU/ml 备检。

3.4 病毒中和 在无菌小管中进行病毒中和。取已稀释的供试品悬液 0.2ml，加等量的抗

水痘病毒免疫血清，再加 0.6ml 疫苗稀释液，充分混匀后，置 37℃ 培养箱中和 60 分钟。

3.5 接种和培养 吸尽已生成单层细胞的培养板孔中细胞培养液。取供试品-血清中和物，接种于含有细胞的 6 孔培养板，每份样品接种 2 孔，100 μ l/孔，放 37℃ 培养箱吸附 60 分钟后，每孔补加 3ml 细胞培养液，置于 37℃，4%~5%CO₂ 培养箱培育 7~10 天后进行染色。

3.6 染色 弃培养液，用 PBS 洗一次后，每孔加考马斯蓝染 1~2ml，室温放置 10 分钟，弃染液，流水冲洗，晾干，计数细胞病变噬斑。

4 对照的设置

4.1 正常细胞对照 每次鉴别试验时应至少有 2 孔正常细胞对照。以疫苗稀释液替代供试品，每孔 100 μ l。正常细胞对照不应有任何细胞病变出现。

4.2 免疫血清对照 取 200 μ l 的 20 个中和单位抗水痘病毒免疫血清，加 800 μ l 的疫苗稀释液，充分混匀，置 37℃ 培养箱中和 60 分钟后，接种于含有细胞的 6 孔培养板，100 μ l/孔，共接种 2 孔。免疫血清对照不应有任何细胞病变出现。

4.3 病毒对照 取供试品原液 (≥ 1000 PFU/ml) 直接进行病毒滴定，病毒对照的病毒滴度不低于 500PFU/ml，其试验步骤见后续的病毒滴定试验。

5 结果判定

水痘疫苗病毒应被完全中和，并不应有其他病变出现。

6 附录（溶液配制）

6.1 青链霉素（1 万单位/ml）液配制

青霉素	100 万单位
链霉素	100 万 μ g

溶于 100ml 灭菌双蒸水中，小量分装后 -20℃ 保存，有效期一年。

6.2 7.5%碳酸氢钠溶液配制

碳酸氢钠	75g
双蒸水加至	1000ml

用 0.22 μ m 滤器除菌过滤，小量分装后 4℃ 保存备用。

6.3 磷酸盐缓冲液（PBS，pH 7.2~7.4）

分装后 121℃ 15 分钟高压灭菌，小量分装后 4℃ 保存备用。

6.4 谷氨酰胺（100 倍液缩）液，-20℃ 以下保存备用。

6.5 基础培养液（MEM）配制

取 MEM 干粉 9.4g，溶于 1000ml 双蒸水中，混匀后分装，121℃ 15 分钟高压灭菌，于 4℃ 保存备用。

6.6 细胞培养液（临用时）配制

MEM	90.0ml
胎牛血清	10.0ml
青、链霉素液	1.0ml
谷氨酰胺	1.0ml
7.5%碳酸氢钠溶液	1.0ml

6.7 病毒稀释液（临用时）配制

50% (W/V) 蔗糖 10.0ml

10% (W/V) 谷氨酰胺 1.0ml

6.8 考马斯蓝染液配制 称取考马斯蓝 (R250) 0.5g, 溶解于 50ml 蒸馏水中, 磁力搅拌。加 90ml 乙醇和 20ml 乙酸, 加蒸馏水至 200ml。

起草人: 权娅茹

复核人: 李长贵

病毒滴定 (热稳定性试验)

1 原理

《欧洲药典》《英国药典》、WHO 和现行版《中国药典》三部均推荐采用蚀斑法进行病毒滴定。蚀斑是指病毒在已长成的单层细胞上形成的局限性病灶。理论上, 一个感染颗粒产生一个蚀斑, 因此, 可由染色后产生的蚀斑数计算出原始病毒液中的感染性颗粒的含量, 通常以每 1ml 中所含的蚀斑形成单位数 (PFU/ml) 来表示病毒的含量。

VZV 在人二倍体细胞中增殖能引起细胞病变, 因 VZV 具高度的亲细胞活性, 感染性病毒难于游离出宿主细胞, 只感染邻近细胞, 培养 7~10 天后, 加入考马斯亮蓝染色, 活细胞被染成蓝色, 病变细胞形成蚀斑的退化细胞区, 不着色, 可通过肉眼计数蚀斑数来计算病毒滴度。

对病毒采用蚀斑法滴定时, 因不同的细胞基质对同一病毒的敏感性不同, 细胞基质的传代次数不同, 其敏感性也不同, 因此需对细胞基质及细胞代次进行验证。结果统计时, 要选择斑点数适中、清晰可数的稀释度来计算最后的滴度。一般选择 10~50 个斑计数。

《欧洲药典》《英国药典》、WHO 和现行版《中国药典》三部在水痘减毒活疫苗病毒滴定的取样量和结果判定等方面均有一定差异。《欧洲药典》和《英国药典》规定取 1 支参考品进行 3 次平行病毒滴定, 以验证检测过程的有效性, 疫苗至少取 3 瓶进行独立测定, 计算每一瓶的病毒滴度以及 3 瓶疫苗的综合病毒滴度, 并在结果判定中引入统计学分析方法设定试验成立条件, 参考品 3 次重复结果估计病毒含量的 95% 可信区间大于 $\pm 0.31g$ PFU; 参考品的病毒滴度偏离设定值超过 0.51g PFU, 试验不成立。WHO 则建议取最少 5 瓶疫苗进行独立测定。现行版《中国药典》三部规定取疫苗 3~5 瓶混合后滴定, 同时用病毒参考品进行滴定。

2 材料与设备

2.1 供试品: 至少 3 支。

2.2 水痘减毒活疫苗滴定参考品: 1 支。

2.3 细胞: 人二倍体细胞 (MRC-5 或 2BS)。

2.4 细胞培养液、病毒稀释液、磷酸盐缓冲液、细胞消化液。

2.5 细胞培养板。

2.6 生物安全柜、CO₂ 培养箱、倒置光学显微镜等。

3 操作方法

3.1 细胞制备 选择细胞界限清晰,具有立体感,形态好,已长成片的人二倍体细胞,弃去原培养液,加适量细胞消化液消化细胞,待细胞面出现针尖样小孔或轻摇细胞边缘有脱落时,弃掉消化液,用灭菌吸管吸取数毫升细胞培养液分散细胞,并稀释至约 1×10^5 个/ml 的细胞悬液,接着,将稀释好的细胞悬液接种于 6 孔细胞培养板中,每孔 3ml,置于 37°C 、4%~5% CO_2 培养箱培育 3~4 天后接种样品。

3.2 供试品稀释 于无菌小管中进行供试品稀释。取供试品至少 3 支,每支按供试品标示量用无菌注射用水溶解后合并,并充分混匀。

将混合后的供试品以适当浓度(如 10 倍、100 倍、200 倍)稀释至所需稀释度。

3.3 供试品接种及培养 吸尽已生长成单层细胞的培养板孔中细胞培养液。用移液器分别取不同稀释度的供试品液,加入已接种细胞的 6 孔细胞培养板中,每个稀释度接种 2 孔,0.1ml/孔, 37°C 吸附 60 分钟后,每孔补加 3ml 病毒培养液,置 37°C 、4%~5% CO_2 培养箱培育 7~10 天后进行染色。

3.4 染色 弃培养液,每孔加考马斯蓝染 1~2ml,室温放置 10 分钟,弃染液,流水冲洗,晾干,计数细胞病变噬斑。

4 对照系统的设立

4.1 病毒参考品 病毒滴定参考品的试验步骤、结果判定、结果计算方法同供试品。

病毒滴定参考品的滴定结果在标示的滴度范围内,该试验有效。

4.2 细胞对照 每次供试品滴定时应至少有 2 孔正常细胞对照,以疫苗稀释液替代供试品液,每孔 0.1ml。正常细胞对照不应有任何细胞病变噬斑出现。

5 结果判定及计算

以 10~50PFU/孔的供试品稀释度噬斑数为有效结果进行计算。计算公式为:

$$\lg\text{PFU}/0.1\text{ml} = \lg\text{PFU}/\text{孔} \times \text{稀释倍数}$$

$$\lg\text{PFU}/0.5\text{ml} = \lg\text{PFU}/0.1\text{ml} + 0.7$$

$$\lg\text{PFU}/\text{ml} = \lg\text{PFU}/0.1\text{ml} + 1$$

6 热稳定性试验

每批供试品取 3~5 支,于 37°C 放置 7 天后,与常规贮存温度下的供试品同时做病毒滴定。其滴定方法及结果判定的计算方法同上。

备注:溶液配制见鉴别试验。

起草人: 权娅茹

复核人: 李长贵

双价肾综合征出血热灭活疫苗

简 述

病毒性出血热是一组由媒介病原微生物所引起的以发热和出血为主要临床症状的急性传染病。肾综合征出血热是由布尼亚病毒科的汉坦病毒属病毒引起，以发热、出血、肾功能损害和免疫功能紊乱为突出表现的自然疫源性疾病。汉坦病毒颗粒具有多形性，呈圆形或卵圆形，直径75~210nm。病毒基因组为单负链RNA，分为大(L)、中(M)、小(S)三个片段。自1980年，国内外先后成功分离出各型别的汉坦病毒后，经过几十年的努力，已成功研制出数种灭活疫苗，并已取得了良好的防病效果。我国先后研制成功了I型肾综合征出血热灭活疫苗、II型肾综合征出血热灭活疫苗、双价肾综合征出血热灭活疫苗及双价肾综合征出血热纯化疫苗。目前市场上使用的均为双价肾综合征出血热灭活疫苗。这些疫苗都已大批量规模化生产，并已建立了国家标准。该疫苗在我国已使用约20年，每年约使用200万剂，具有较好的安全性和免疫效果。

《中国药典》2015年版中收录了双价肾综合征出血热灭活疫苗(沙鼠肾细胞、地鼠肾细胞和Vero细胞)的制造及检定规程。

双价肾综合征出血热灭活疫苗检定应依据现行版《中国药典》或其他国家药品标准进行，并应符合相关要求。

双价肾综合征出血热灭活疫苗的检定项目按照生产阶段分为单次病毒收获液、单价原液、半成品、成品。其中单次病毒收获液检定主要包括病毒滴度、无菌检查、支原体检查、抗原含量、病毒灭活验证试验；单价原液检定包括蛋白质含量、抗原含量、无菌检查、牛血清白蛋白残留量、Vero细胞蛋白质残留量和Vero细胞DNA残留量检测或地鼠肾细胞蛋白质残留量；半成品检定主要包括无菌检查；成品检定包括鉴别试验，外观、渗透压摩尔浓度、装量、效价测定、热稳定性试验；化学检定主要包括pH值、蛋白质含量、硫柳汞含量、氢氧化铝含量、游离甲醛含量；无菌检查、异常毒性检查、抗生素残留量和细菌内毒素检查。

对于双价肾综合征出血热灭活疫苗，其制品特异检测项目主要有鉴别试验和效价测定。

鉴别试验和效价测定

2015年版《中国药典》三部采用测定效力试验的蚀斑减少中和试验进行出血热I型和II型病毒的鉴别。效力测定合格，鉴别试验符合规定。2015年版《中国药典》第一增补本增加效价测定不合格，采用RT-PCR方法进行鉴别试验。

1 原理

病毒接种于长成单层的敏感细胞，再在细胞上覆盖琼脂，由于固体介质的限制，病毒只能感染并破坏邻近的细胞，造成细胞溶解而形成空斑，空斑形成后，经中性红染色，活细胞显示红色，而空斑区细胞不着色，形成不染区域，即为肉眼可见的空斑。每个空斑由一个病毒颗粒造成。计数空斑数量，即得相应的病毒含量。

一定量的出血热病毒与不同稀释度的出血热疫苗特异性免疫血清中和后,具有感染性的出血热病毒含量会降低,形成的空斑数会减少。血清稀释度不同,中和后,未被中和病毒数不同,造成空斑减少数不同,我们以空斑数少于病毒对照组 50%的最高血清稀释度为该免疫血清的中和效价。

2 双价肾综合征出血热灭活疫苗效价测定家兔免疫

2.1 材料

2.1.1 实验动物 新西兰白色家兔,体重 2000g 左右,清洁级或清洁级以上家兔。

2.1.2 材料 5ml 一次性注射器、6 孔板。

2.2 操作方法

2.2.1 家兔的准备 新西兰白色家兔,体重 2000g 左右,雌雄不分,随机分组,每批疫苗至少 4 只。在实验动物室适应饲养 1~2 天,确认健康状况良好的家兔用于疫苗免疫。

2.2.2 家兔的免疫

2.2.2.1 每只家兔先编号,一笼一只,标签应写明供试品名称、生产企业、批号、检品惟一标识号和注射免疫等信息。

2.2.2.2 免疫前先空腹心脏采血 2~3ml,放置 4℃。以备分离血清。

2.2.3 分离好的血清存 -20℃ 以下保存。

2.2.4 采血后每只家兔后腿肌内注射供试品 1.0ml (或一个人用剂量),根据不同供试品的各自规定,间隔一周或二周再肌内注射每只 1.0ml。

2.2.5 第一针注射后的四周行心脏采血,每只至少采血 5ml,分离血清以前的全血必须置 4℃ 冰箱,适当时间后分离血清,血清须放置 -20℃ 以下保存,以备测中和抗体。

2.2.6 采血完成后通知饲养员安乐处死实验兔子。

3 中和试验

3.1 材料和设备

3.1.1 材料 待测血清、参考血清、出血热病毒 76-118 株和 UR 株、Vero-E6 细胞;24 孔细胞培养板、1.0ml 吸管、5.0ml 吸管、1000 μ l 移液器、八道 5~50 μ l 和 50~300 μ l 移液器、各种规格的吸头(使用前高压灭菌)。

3.1.2 试剂 MEM 培养液、灭活胎牛血清、3%谷氨酰胺溶液、各 10000u/ml 的青霉素和链霉素混合液、1mol/L 中性红染色液、1.7%琼脂糖、7.5%碳酸氢钠溶液。

3.1.3 设备 二氧化碳培养箱、生物安全柜、水浴锅。

3.2 操作方法

3.2.1 待测血清的准备 试验前将血清置 56℃ 水浴灭活 30 分钟。

3.2.2 攻击病毒的准备 将 I 型病毒 76-118 株和 II 型病毒 UR 株以 Vero-E6 细胞培养,收获病毒液,合并离心取上清液,加入 20%灭活胎牛血清,分装小管(使其能一次用完),-70℃ 以下冰冻保存。取分装后的病毒液进行病毒滴度测定,病毒滴度以蚀斑形成法测定。病毒滴度不低于 6.0lgPFU/ml 方可用于中和试验。

3.2.3 细胞的准备 制备浓度为 6×10^5 /ml 的 Vero-E6 细胞悬液,接种于 24 孔细胞培养板中,每孔 1ml,37℃ 5%二氧化碳培养箱培养 48 小时备用。

3.2.4 攻击病毒的稀释 根据 3.2.2 病毒滴定的结果,将病毒稀释成每 1ml 含 250 ± 50 个

PFU 的病毒使用液。

3.2.5 待测血清的稀释 将同批供试品的 4 只家兔的免疫前和免疫后血清分别进行稀释, 免疫前血清进行 1:10 稀释, 免疫后血清进行 1:10 和 1:20 稀释。血清稀释可以在 24 孔板中或用小试管稀释。

3.2.6 血清和病毒的中和 血清和病毒各 0.2ml 混合后, 4℃ 过夜中和或 37℃ 中和 1 小时。

3.2.7 培养 将中和物按 0.1ml/孔接种于已长满细胞的 24 孔板中, 每个稀释度接种 2 孔。于 37℃ 5% 二氧化碳培养箱吸附 1.5 小时, 每隔 15 分钟轻摇细胞培养板一次。

3.2.8 加琼脂糖覆盖物 每孔加入琼脂糖覆盖物 1.0ml, 放置数分钟, 待琼脂糖凝固后置 37℃ 5% 二氧化碳培养箱中, 并避光放置。6 天后加含中性红染液的第二层琼脂糖覆盖物。待凝固后继续放置 37℃ 5% 二氧化碳培养箱。

3.2.9 蚀斑计数 24~48 小时内计数形成的蚀斑数。

4 结果判定

空斑数 ≤ 病毒对照组空斑数 50% 的最高血清稀释度为此血清的中和效价。

起草人: 孔艳

复核人: 李五华

人用狂犬病疫苗

简 述

狂犬病又称恐水病, 是由狂犬病病毒 (Rabies Virus, RV) 感染引起的致死性人兽共患传染病。一旦发病, 几乎 100% 死亡, 目前世界上仅有极个别发病后治愈的病例, 且争议较大。人主要是通过被病兽咬伤而感染狂犬病毒。由于人与狗和猫在日常生活中的密切关系, 所以狗和猫是人类感染狂犬病毒的最重要传染源。人狂犬病的临床特征为脑脊髓炎, 发病早期主要表现为兴奋、恐水、畏光和风、怕声响、咽喉肌痉挛、进行性瘫痪等。人用狂犬病疫苗系采用经批准的狂犬病病毒固定毒, 如 CTN 株、aGV 株、PM 株等, 接种于 Vero 细胞、人二倍体细胞或其他细胞系, 经培养、收获、浓缩、灭活病毒、纯化后, 加入人血白蛋白及相应稳定剂冻干制成, 主要用于预防狂犬病。目前国内外人用狂犬病疫苗生产用毒种主要有 CTN 株、aG 株、PV 株, PM 株和 Flury-LEP 株。

人用狂犬病疫苗的生产应在符合 GMP 的厂房下生产, 并符合现行版《中国药典》或其他国家药品标准要求。疫苗质量控制涉及疫苗生产的全过程, 应对生产过程中的每一个工艺环节以及使用的每一种材料进行质量控制, 并制定其用于生产的质量控制标准。

根据人用狂犬病疫苗生产工艺的特点,其质量控制包括对单次收获物、原液、半成品和成品的质量控制。由于该疫苗为非最终灭菌产品,除了强调全过程的无菌操作外,在各个阶段都需要进行无菌检查,以确保疫苗的安全性。对成品检定项目的设置主要是依据人用狂犬病疫苗的质量属性,重点对其安全性、有效性、批间一致性和均一性进行控制。如效价测定和热稳定性试验为保证疫苗的有效性。pH、渗透压、水分是疫苗的理化指标,影响疫苗的稳定性和免疫效果。现阶段,pH常用电位法检测,渗透压常用冰点下降法检测,水分常用卡尔-费休氏法检测。无菌检查、异常毒性检查和细菌内毒素含量是安全性指标,牛血清白蛋白和抗生素是工艺相关杂质。牛血清白蛋白残留来源于细胞培养和病毒增殖时使用的培养基,采用ELISA法检测。抗生素残留来源于细胞制备和增殖过程中的抗生素添加,采用ELISA法检测。

抗原含量

1 原理

双抗体夹心 ELSIA,用于检测人用狂犬病疫苗中狂犬病病毒糖蛋白抗原含量。

2 材料和设备

2.1 材料 用多株抗狂犬病毒特异性单克隆抗体包被的96孔板,抗狂犬病毒糖蛋白酶标抗体,稀释液、洗液、底物液A、B液及终止液等ELISA常规试剂,狂犬病疫苗抗原测定用国际标准品,移液器及相应Tip头。

2.2 设备 酶标仪、恒温水浴箱。

3 操作方法

3.1 标准品稀释:取冻干品1支复溶1.0ml,适当稀释后混匀备用;供试品稀释:取液体供试品(冻干供试品按疫苗说明书复溶),适当稀释后混匀备用。

3.2 每孔各加稀释液100 μ l,将标准品及供试品各加100 μ l/孔,倍比稀释(每次稀释应更换Tip头),轻轻震荡混匀,稀释最后一列时弃去每孔多余的100 μ l液体,空白孔不加样品稀释液和样品。

3.3 用封口膜覆盖包被板,置于37 $^{\circ}$ C湿盒温育1小时。

3.4 弃去板中液体,甩干,用洗涤液加满各孔,再弃去板中液体,甩干;重复洗板5次。

3.5 加入酶结合物(空白孔不加),每孔100 μ l,37 $^{\circ}$ C湿盒温育30分钟。

3.6 弃去板中液体,甩干,用洗液加满各孔,再弃去板中液体,甩干;重复洗板5次。

3.7 依次加入底物液A、B液,每孔50 μ l,置37 $^{\circ}$ C避光显色15分钟。

3.8 立即加入终止液,每孔50 μ l;置于酶标仪450nm波长处,读取各孔A值。

4 结果判定与计算

将标准品A值为横坐标,以标准品抗原含量(IU/ml)为纵坐标作散点图,采用Excel软件进行二项式回归,得回归方程, $R^2 \geq 0.99$ 。根据供试品的A值计算供试品的糖蛋白抗原含量。

起草人:曹守春 王云鹏

复核人:李玉华

效价测定法

1 原理

主要是通过小鼠免疫疫苗后的抗体变化来测定疫苗的免疫原性，即采用狂犬病疫苗先进行腹腔注射免疫，在 0, 7 日各免疫一次。之后间隔 7 日取狂犬病病毒标准攻击毒株（CVS 株）颅腔攻击，供试品组和标准品组同步试验，观察记录小鼠的死亡率。采用 Reed-Muench 法计算 ED_{50} ，根据疫苗标准品的效价（IU/ml），最终结算出供试品的效价（IU/剂）。

2 材料

- 2.1 供试品和疫苗国家标准品。
- 2.2 实验用清洁级以上小鼠。
- 2.3 标准攻击毒株（CVS 株）。
- 2.4 PBS 溶液。
- 2.5 不同规格吸管和试管、不同规格注射器及相应的针头。

3 操作方法

3.1 检测用标准攻击病毒的准备

3.1.1 攻击病毒的传代 取冻干毒种（内含 0.5ml 的 20% 鼠脑脱脂牛乳悬液，启开，加入 1ml 稀释液，使之成为 10% 鼠脑悬液，经每分钟 1000 转离心沉淀 10 分钟，取上清液作 10 倍稀释，使之成为 10^{-2} 悬液。脑内接种体重 10~12g 小鼠，每只 0.03ml。一般毒种应连续在小鼠脑传 2~3 代，用第 3 代鼠脑制备检定用攻击毒种。收取鼠脑时应选择 4~5 天有典型狂犬病症状的小鼠脑组织，及时研磨制备成攻击毒种。

3.1.2 低温保存毒种的制备 将鼠脑研磨并加入 2% 小牛血清的蒸馏水，制备成 20% 的悬液，经每分钟 1000 转沉淀 10 分钟，吸取上清液，分装小管，贮存于 -70°C 冰箱中，待病毒滴度测定合格后，则可作攻击毒用。

3.1.3 真空冷冻干燥毒种的制备 将鼠脑研磨并加入脱脂牛乳制成 20% 脑悬液，每安瓶分装 0.5ml，经冷冻干燥制成。使用时启开，加入 1ml 稀释液，制 10^{-2} 悬液，经每分钟 1000 转离心 10 分钟，取上清再稀释至合适的滴度即可作攻击毒用。

3.2 疫苗标准品 疫苗标准品是由中国食品药品检定研究院委托某一生产企业精制并精确分装冻干而成，经国内多家企业和实验室与 WHO 标准品标定，经国家生物制品标准化委员会批准后使用，国家标准品的装量、稀释倍数、 ED_{50} 范围和效价按每批标准品发布时的数据而定。标准品应贮存于 -20°C 以下，复溶后要立即使用。

3.3 供试品 供试品用 PBS 作 5 倍系列稀释，一般采用 1:5、1:25、1:125 和 1:625，可选择其中的连续三个稀释度。在稀释过程中和稀释结束后的供试品均需置冰浴，直至免疫结束。

3.4 免疫 选择体重 12~14g 小鼠，免疫时应同时有标准品和攻击病毒 LD_{50} 测定的对照小鼠。标准品可用 1:25、1:125 和 1:625 三个稀释度。免疫时应先接种高倍稀释度供试品/标准品，然后依次接种低倍稀释度供试品/标准品。每只小鼠腹腔接种 0.5ml，免疫时针头先通过皮下后再注入腹腔，间隔一周后再免疫一次，每个稀释度至少免疫 16 只小鼠。

3.5 攻击 攻击病毒应预先测定，并稀释成 0.03ml 内含 5~100 LD_{50} 的病毒量，即为攻击

病毒液。

3.6 攻击病毒含量的确认试验 在进行疫苗效价测定时，应对攻击病毒进行病毒含量确认，以确定每只小鼠的脑内攻击病毒量在设定的 $5\sim 100LD_{50}$ 范围内；攻击病毒测定时应做已稀释成的攻击病毒原液 10^0 、 10^{-1} 、 10^{-2} 和 10^{-3} 的四个稀释度，每个稀释度的接种小鼠不得少于 10 只，接种时应从 10^{-3} 开始至原液（ 10^0 ）；攻击后的前 4 天非特异死亡的小鼠不计，但非特异死亡数不得大于该组动物的 20%，攻击后第 4 天，进行小鼠计数。所有小鼠自攻击之日起逐日观察 14 天，第 5 天后死亡和呈现典型狂犬病症状的作为因狂犬病死亡而计算在内。判定结果时，要求攻击病毒的原液组小鼠 80% 死亡。

3.7 供试品组小鼠的脑内攻击 于第二次免疫后一周，用预先测定含 $5\sim 100LD_{50}$ 的病毒量作脑内攻击，每只小鼠脑内注射 0.03ml，攻击后的前 4 天非特异死亡的小鼠不计，但非特异死亡数不得大于该组动物的 20%，攻击后第 4 天进行小鼠计数。所有小鼠自攻击之日起逐日观察 14 天，第 5 天后死亡和呈现典型狂犬病症状的作为因狂犬病死亡而计算在内。如攻击毒力低于 5 或大于 $100LD_{50}$ 或供试品免疫组、标准品组中任一稀释度小鼠非特异性死亡超过规定的，试验应重试。

4 效价测定结果的计算（举例）

计算相对效力：

$$P = \frac{T}{S} \times \frac{dT}{dS} \times 5$$

式中 P 为供试品的效价，IU/ml；

T 为供试品 ED_{50} 的例数；

S 为标准品 ED_{50} 的例数；

dT 为供试品 1 次人用剂量，ml；

dS 为标准品的 1 次人用剂量，ml；

D 为标准品效价，IU/ml。

5 注意事项

- (1) 动物免疫时，疫苗应保存于冰浴中。
- (2) 各组动物应在相同物料下饲养。
- (3) 攻击毒原病毒液（ 10^0 ）注射的小鼠应 80% 以上死亡。

起草人：曹守春 石磊泰

复核人：李玉华

宿主细胞蛋白质残留量测定法

1 原理

宿主细胞蛋白质（HCP）残留是指生物制品中含有的宿主细胞的蛋白质成分。通常采用 ELISA 法测定制品中 HCP 的残留量。

把具有免疫活性的 HCP 特异性抗体结合到某种固相载体上，将供试品与酶标抗体按不同的步骤与固相载体上的抗体进行免疫反应后，加入酶标反应底物，底物被酶催化产生的有色产物

的量与供试品中 HCP 的量直接相关。特定波长下测定有色产物的 OD 值,以 HCP 标准品含量与对应的吸光度 (OD 值) 形成标准曲线,根据供试品 OD 值进行 HCP 的定量分析。

2 材料和设备

2.1 材料 酶标抗体、HCP 标准抗原、内控品、稀释液、洗液、底物液及终止液等 ELISA 常规试剂;96 孔酶联反应板、加液槽、吸水纸、移液器及相应 Tip 头等。

2.2 设备 恒温水浴箱、酶标仪。

3 操作方法

3.1 将宿主蛋白残留量 ELISA 检测试剂和供试品平衡至室温。

3.2 标准品反应 将 HCP 标准抗原,按其蛋白浓度由低到高加至包被好的酶标板,每个浓度做 2 孔。内控品也按照说明书要求复溶后,加至包被好的酶标板。

3.3 样品反应 样品用稀释液稀释至标准曲线范围内的相应浓度,加至酶标板,每个稀释度做 2 孔;同时加入阴性对照和空白对照各 2 孔,封板,将加有供试品的 ELISA 板置于相应温度,温浴相应时间。

3.4 酶标抗体的孵育 洗板 5 次后,将酶标抗体加入酶标板,封膜,将 ELISA 板置于相应温度,温浴相应时间。

3.5 显色 洗板后,将底物液加入板中显色,封膜后,按说明书置于相应条件温浴相应时间。

3.6 终止及比色 显色结束后,加入终止液终止反应。置于酶标仪,按说明书规定波长进行吸光值测定。

4 计算

以 HCP 标准品的浓度及其对应的吸光度,按照说明书规定的分析方法,确定标准曲线;将供试品吸光度代入标准方程,得出供试品中 HCP 含量;供试品的 HCP 残留量 = 方程计算结果 × 相应稀释倍数。

5 结果与判定

5.1 根据 ELISA 检测试剂要求,标准曲线的 R^2 值、内控品浓度均应符合要求,试验成立。

5.2 试验成立,方可计算供试品 HCP 残留量浓度。

5.3 按照质量标准规定,对供试品的检测结果进行判定。

6 注意事项

6.1 试验开始前,应将检测用试剂和供试品平衡到室温。

6.2 严格按照试剂说明书进行操作。

6.3 酶标仪应提前开启预热。

6.4 应尽可能取吸光度在标准曲线中间位置,且稀释度低的稀释度进行供试品结果计算。

起草人:王玲

复核人:李玉华

Vero 细胞宿主 DNA 残留量测定法

1 原理

供试品中的外源性 DNA 经变性为单链后吸附于固相膜上,在一定条件下可与相匹配的单链 DNA 复性而重新结合成为双链 DNA,称为杂交。将特异性单链 DNA 探针标记后,与吸附在固相膜上的供试品单链 DNA 杂交,并使用与标记物相应的显示系统显示杂交结果,与已知含量的阳性 DNA 对照比对后,可测定供试品中外源性 DNA 残留量。本检测法适用于 Vero 细胞培养的病毒性疫苗制品,用于检测以 Vero 细胞为生产基质生产的疫苗中宿主 DNA 残留量检测。

2 材料和设备

2.1 材料

2.1.1 DNA 探针标记和检测试剂盒。

2.1.2 DNA 杂交膜:阳离子尼龙膜。

2.1.3 2%蛋白酶 K:配制 50mmol/L Tris-Cl (pH 8.0) 和 1.5mmol/L 醋酸钙溶液 100ml,称取蛋白酶 K 2.0g,充分溶解,分装后储藏于-20℃备用,勿反复冻融。

2.1.4 1.0mol/L 三羟甲基氨基甲烷 (Tris) 溶液 (pH 8.0):用盐酸调 pH 值至 8.0,高压蒸汽灭菌。

2.1.5 0.5mol/L 乙二胺四乙酸二钠溶液 (pH 8.0):用 10mol/L NaOH 调节 pH 至 8.0,高压蒸汽灭菌。

2.1.6 20%十二烷基硫酸钠 (SDS) 溶液:用浓盐酸调 pH 至 7.20,高压后室温保存。

2.1.7 3.0mol/L 醋酸钠溶液:取 800ml 双蒸水溶解 408.3g 三水醋酸钠,用冰乙酸调 pH 至 5.0,定容至 1L,过滤除菌后分装备用。

2.1.8 10× 蛋白酶缓冲液 (pH 8.0)

1mol/L Tris 溶液 (pH 8.0)	1.0ml
0.5mol/L EDTANa ₂ 溶液 (pH 8.0)	2.0ml
20% SDS 溶液 (PH 7.2)	2.5ml
加灭菌双蒸水至	10ml

2.1.9 TE 缓冲液 (pH 8.0):量取 1mol/L Tris 溶液 (pH 8.0) 10ml, 0.5mol/L 乙二胺四乙酸二钠溶液 (pH 8.0) 2ml, 加灭菌水至 1000ml, 4℃ 保存。

2.1.10 Buffer I: 11.6g 顺丁烯二酸, 8.76g NaCl, 固体 NaOH 调 pH 至 7.5 后, 定容至 1L。

2.1.11 Buffer II: 7.88g Tris-HCl, 2.93g NaCl, 5.08g MgCl₂, 1mol/L NaOH 调 pH 至 9.5, 定容至 500ml。

2.1.12 20× SSC: 88.2g 柠檬酸钠, 175.3g NaCl, 浓盐酸调 pH 至 7.0, 定容至 1L, 高压后 4℃ 保存。

2.1.13 Tris 饱和酚。

2.1.14 Vero 细胞 DNA 定量国家参考品 (限杂交法)。

2.2 设备 恒温金属浴、冷冻离心机、超低温冰箱、紫外交联仪、杂交混悬仪、水平

摇床。

3 操作方法

3.1 探针标记

3.1.1 变性 取适量探针标记用 Vero 细胞 DNA(2 μ g, 超声处理, 片段大小在 100~1000bp 之间), 用去离子水补足至 16 μ l, 置 100 $^{\circ}$ C 水浴加热 10 分钟, 迅速冰浴冷却, 以每分钟 8000 转离心 5 秒。

3.1.2 标记 加入试剂盒提供的随机引物 4 μ l, 混匀, 37 $^{\circ}$ C 过夜。

3.1.3 终止及沉淀 0.5mol/L 乙二醇四乙酸二钠溶液(pH 8.0)3 μ l 终止反应, 并加入 3mol/L 醋酸钠溶液 2 μ l, -20 $^{\circ}$ C 预冷无水乙醇 300 μ l, -70 $^{\circ}$ C 以下作用 2 小时。

3.1.4 洗涤: 15000g 低温离心 15 分钟, 弃上清, -20 $^{\circ}$ C 预冷 75% 乙醇 600 μ l 洗涤沉淀 1 次。

3.1.5 离心: 15000g 低温离心 20 分钟, 弃上清。

3.1.6 复溶: 室温吹干, 加 100 μ l TE 缓冲液溶解。

3.2 测定法

3.2.1 蛋白酶 K 预处理 按表 1 对 Vero 细胞 DNA 参考品和供试品进行加样, 混和后 37 $^{\circ}$ C 保温 2 小时。

表 1 参考品/供试品处理加样量

样本	加样量	2%蛋白酶 K 溶液	蛋白酶缓冲液	去离子水
DNA 参考品	500 μ l	5 μ l	60 μ l	35 μ l
供试品	500 μ l	5 μ l	60 μ l	35 μ l

注: 供试品的稀释, 选用供试品标示剂量, 若规格为 1.0ml/剂的制品应分两管加样。

3.2.2 DNA 抽提及沉淀 加入饱和酚溶液 600 μ l, 剧烈混合 15~30 秒, 15000g 离心 10 分钟; 小心移取上层液体至一干净离心管中, 加入 3mol/L 醋酸钠溶液 60 μ l, 充分混合, 再加入 -20 $^{\circ}$ C 预冷异丙醇 600 μ l, -20 $^{\circ}$ C 过夜; 15000g 低温离心 15 分钟, 弃上清液, -20 $^{\circ}$ C 预冷的 75% 乙醇溶液 500 μ l 洗涤沉淀; 15000g 低温离心 15 分钟, 弃上清液, 室温通风干燥 (或 65 $^{\circ}$ C 干燥 30 分钟); 加 100 μ l TE 缓冲液溶解 (参考品采用 200 μ l TE 溶解)。

3.2.3 点膜 将 DNA 参考品、上述提取供试品及探针置 100 $^{\circ}$ C 水浴加热 10 分钟, 迅速置冰浴冷却, 以每分钟 8000 转离心 5 秒; 将 DNA 参考品用 TE 缓冲液进行 10 倍系列稀释, 使其终浓度分别为 10ng/100 μ l、1ng/100 μ l、100pg/100 μ l、10pg/100 μ l、1pg/100 μ l; 取杂交膜浸润于 TE 缓冲液中, 检查杂交膜完整性, 然后组装抽滤加样器; 无尘环境下将 100 μ l 参考品、供试品和阳性参考品全部点样; 杂交膜置 TE 缓冲液浸润的滤纸上, 紫外交联 (根据紫外交联仪功率适当调整时间和距离)。

3.2.4 杂交与显色 预杂交, 取无菌培养皿, 加适量已 45 $^{\circ}$ C 预热的杂交液, 将杂交膜全部浸泡于其中, 放于 45 $^{\circ}$ C、10 转/分钟杂交仪中预杂交 30 分钟; 杂交, 弃预杂交液, 加入适量新鲜预热杂交液 (45 $^{\circ}$ C) 及全部探针, 45 $^{\circ}$ C 杂交过夜; 高盐洗脱: 取无菌培养皿, 适量 2 \times SSC (0.1%SDS), 将杂交膜全部浸泡于其中室温下, 置水平脱色摇床, 5 分钟 (10 转/分钟), 2 次;

低盐洗脱, 取无菌培养皿, 加适量 $0.5\times$ SSC (0.1%SDS), 置 45°C 、杂交仪 (10 转/分钟), 洗脱 15 分钟, 1 次; 平衡, 取无菌培养皿, 加适量 Buffer I, 将杂交膜全部浸泡于其中, 室温下 5 分钟 (10 转/分钟); 抗体孵育, 取无菌培养皿, 加适量封闭液, 将杂交膜全部浸泡于其中, 室温 30 分钟 (10 转/分钟), 弃封闭液, 加入新鲜封闭液, 同时加入抗体, 10 转/分钟, 60 分钟; 洗脱, 取无菌培养皿, 加适量 Buffer I (0.1%吐温 20), 将杂交膜全部浸泡于其中, 室温 15 分钟 (10 转/分钟), 2 次; 平衡, 取无菌培养皿, 加适量 Buffer II, 将杂交膜全部浸泡于其中, 室温下 5 分钟 (10 转/分钟); 显色, 取无菌培养皿, 加适量 Buffer II、NBT (5#, 1:200), 将杂交膜全部浸泡其中, 室温下避光静置至显色完毕 (时间不得超过 4 小时); 终止反应, 将杂交膜置 TE 溶液 5 分钟, 湿膜扫描或拍照、风干并封膜。

4 结果与判定

将供试品与 DNA 参考品进行比较, 根据显色的深浅判定供试品中外源性 DNA 的含量。

5 注意事项

DNA 参考品应显色, 其颜色深度与 DNA 含量相对应, 10 倍稀释显色点应呈一定的颜色梯度, 且检测灵敏度应不低于 10pg 的检测限。

起草人: 曹守春 李加

复核人: 李玉华

乙型脑炎减毒活疫苗

简 述

流行性乙型脑炎 (简称乙脑) 是由乙脑病毒引起的一种急性神经系统传染病, 主要由蚊虫传播。全球每年约有 68000 例病例, 病死率约 10%~30%, 另有 30%~50% 会引起严重的神经和心理后遗症。乙脑病毒主要感染儿童, 在我国除新疆西藏青海省 (自治区) 外均有发病与流行, 对人民的健康造成极大的危害, 被列为乙类传染病。

接种乙脑疫苗是防治乙脑最经济有效的手段。目前国内外使用最广泛的疫苗为乙脑减毒活疫苗 SA14-14-2。乙脑减毒活疫苗 SA14-14-2 是我国自主研发的一种乙脑疫苗, 1989 年获新药证书并由成都生物制品研究所有限责任公司生产, 以后武汉和兰州生物制品研究所有限责任公司相继投产。疫苗除在国内大规模应用外, 近年来已出口到韩国、尼泊尔、印度等十多个国家。大量人群应用后表明疫苗十分安全, 未发现与疫苗相关的脑炎病例, 免疫效果也经国内外不同乙脑流行区证明效果显著。

乙脑减毒活疫苗检定应依据现行版《中国药典》和其他国家药品标准进行测定, 并应符合相关要求。

乙脑减毒活疫苗的检定内容按照生产阶段分为单次收获液、原液、半成品、成品。其中单次收获液检定包括病毒滴定、无菌检查和支原体检查。原液检定主要包括病毒滴定、无菌检查、支原体检查和逆转录酶活性检查。半成品检定主要包括病毒滴定、无菌检查。成品检定按照检验类别包括鉴别试验、理化检查、效力、安全性检查及添加物残留量控制。鉴别试验主要用于鉴别疫苗主要成分是否为乙脑减毒株 SA14-14-2; 理化检查主要包括外观、可见异物、渗透压摩尔浓度、水分、pH 值。疫苗有效性采用病毒滴定和热稳定性试验来评价。疫苗安全性检查包括脑内致病力试验、乳鼠传代返祖试验、无菌检查、异常毒性检查、细菌内毒素检查。添加物残留主要对牛血清白蛋白残留量、抗生素残留量进行控制。

乙脑减毒活疫苗 SA14-14-2 制品特异性的检测项目有鉴别试验、病毒滴定、热稳定性试验及脑内致病力试验等, 其标准操作规程如下。

鉴别试验

1 原理

乙脑高效价免疫血清可有效中和乙脑病毒, 而对其他病毒中和效果较差, 因此通过评价乙脑高效价免疫血清对疫苗的中和能力来判定疫苗是否为乙脑减毒活疫苗。

2 材料和设备

2.1 BHK-21 细胞, P3 株非同源性高效价免疫血清 (国家参考品, 来自中检院), 供试品。

2.2 细胞培养板、1ml 和 10ml 吸管, 大小试管若干。100 μ l、200 μ l、1000 μ l 加样器和相应的吸头。

2.3 设备 CO₂ 孵箱、生物安全柜。

3 操作方法

3.1 BHK-21 细胞的制备 培养瓶弃去生长液, 加入适量胰酶消化, 再加入适量生长液吹打, 细胞分散后以适当的比例加入生长液传代, 接种 100 或 500ml 的细胞培养瓶中。37 $^{\circ}$ C 培养 4~5 天, 传代制备细胞悬液, 接种已消毒的细胞培养板, 37 $^{\circ}$ C 培养 48 小时备用。

3.2 供试品的稀释 供试品在小试管或 24 孔细胞培养板中作 10 倍系列稀释。

3.3 中和试验

3.3.1 阳性血清: 将已稀释的供试品取 0.3ml 至另一试管中, 用 P3 株病毒免疫的非同源性高效价免疫血清 0.3ml 混合, 置 37 $^{\circ}$ C 90 分钟水浴中和备用。

3.3.2 阴性血清: 已稀释的供试品取 0.3ml 至另一试管中, 用阴性正常血清 0.3ml 混合, 置 37 $^{\circ}$ C 水浴 90 分钟中和备用。

3.4 将中和完毕的阴性和阳性血清病毒血清混合物分别接种 BHK-21 细胞, 每孔 0.2ml, 每个样品接种 2 孔。

3.5 样品接种细胞, 37 $^{\circ}$ C 吸附 60 分钟后, 加覆盖物, 37 $^{\circ}$ C 培养 5 天, 吸出覆盖物, 加结晶紫染色液, 染色 30 分钟后弃去染色液, 用流水冲洗, 即可观看结果。

4 结果计算和判定

分别计算不同稀释度的病毒滴度值 a 和 b, 以 NI (neutralization index) = $10^{(b-a)}$ 公式进行计算, 中和指数大于 1000 即判定结果符合规定。

起草人: 刘欣玉 贾丽丽

复核人: 李玉华

病毒滴定测定法与热稳定性试验

1 原理

病毒感染细胞后, 由于覆盖物的限制, 复制病毒局限于最初感染的细胞, 增殖一段时间后, 即形成一个局限性病变细胞区, 为病毒蚀斑。理论上讲, 一个蚀斑是由最初感染细胞的一个病毒颗粒形成, 因而可用于病毒颗粒计数。

2 材料和设备

- 2.1 BHK-21 株, 供试品, 病毒滴度参考品。
- 2.2 6 孔细胞培养板, 移液器, 吸头, 24 孔细胞培养板。
- 2.3 胰蛋白酶, MEM 细胞培养液, 样本稀释液, 1% 结晶紫染色液, 甲基纤维素覆盖物。
- 2.4 设备 CO₂ 孵箱、生物安全柜。

3 操作方法

- 3.1 BHK-21 细胞制备 细胞悬液接种入培养板, 37℃ 5% CO₂ 孵箱培养, 至长成细胞单层。
- 3.2 供试品/参考品的复溶和稀释 将供试品和参考品 10 倍系列稀释至 10⁻⁵。
- 3.3 病毒接种 选取 10⁻⁴、10⁻⁵ 两个稀释度, 每稀释度接种 2 孔, 接种量为每孔 200μl。
- 3.4 吸附 在 37℃ ± 1℃, 3%~5% CO₂ 孵箱放置 60 分钟, 期间轻摇 2 次。
- 3.5 加覆盖物 用 10ml 无菌玻璃吸管加甲基纤维素覆盖物, 每孔加 4ml。加完覆盖物后, 将 6 孔板放回 CO₂ 孵箱, 继续培养。
- 3.6 染色 用真空泵将覆盖物吸出, 每孔加 2~3ml 1% 结晶紫染色液, 室温染色 20~30 分钟, 用流水冲洗染色液, 于室温晾干 6 孔板。
- 3.7 空斑计数 在观察灯前, 用肉眼计数每孔噬斑数, 复核人复核噬斑数和相应标记。
- 3.8 滴度计算 病毒滴度计算标准: 选取噬斑数均值在 10~99 范围的稀释度计数并进行病毒滴度计算。若两个稀释度噬斑均值均在 10~99 范围内, 应将两个稀释度计算的病毒滴度结果取平均值作为待测样本的滴度结果。

3.9 结果分析

3.9.1 说明: 参考品数值应在标识的滴度范围内, 空白对照无噬斑, 方能判定病毒滴度测定试验成立。

3.9.2 对于乙脑减毒活疫苗成品, 其基础滴度应在企业注册标准范围内。热稳定性试验 (37℃ ± 1℃ 放置 7 天) 病毒滴度应不低于 5.7lgPFU/ml, 病毒滴度下降值应不高于 1.0lg

PFU/ml。

4 结果计算

4.1 滴定结果计算方法

空斑形成单位 (PFU/ml) = (每孔平均噬斑数 × 病毒稀释倍数) / 每孔加样量 (ml)

疫苗滴度 (lgPFU/ml) = $\lg 10^{|X|} + \lg (10^X \text{ 对应的平均噬斑数}) + \lg 5$

式中, |X| 为噬斑数, 10~99 范围的最高稀释度的绝对值; lg5 为每孔接种 0.2ml 换算成 1ml 体积, 因此需乘以 5 倍。

4.2 病毒滴度计算举例

4.2.1 情况 1

稀释度	噬斑数	平均噬斑数
10 ⁻⁴	24, 27	25.5
10 ⁻⁵	3, 2	2.5

选择 10⁻⁴ 稀释度噬斑数进行结果计算如下。

$$\lg \text{PFU/ml} = \lg 10^4 + \lg 25.5 + \lg 5 = 4 + 1.41 + 0.70 = 6.11$$

该批供试品的病毒滴度为 6.11lgPFU/ml。

4.2.2 情况 2

稀释度	噬斑数	平均噬斑数
10 ⁻⁴	105, 110	107.5
10 ⁻⁵	15, 18	16.5

选择 10⁻⁵ 稀释度 16.5 噬斑数进行滴度计算。计算过程略。

4.2.3 情况 3

稀释度	噬斑数	平均噬斑数
10 ⁻⁴	98, 93	95.5
10 ⁻⁵	11, 13	12.0

选择 10⁻⁴、10⁻⁵ 两个稀释度分别计算病毒滴度, 然后取两个滴度的平均值作为最终结果。

5 结果判定

按企业注册标准和现行版《中国药典》要求判定结果。

起草人: 刘欣玉 贾丽丽
复核人: 李玉华

脑内致病力试验

1 原理

小鼠脑组织对乙脑病毒非常敏感，若乙脑病毒具有神经毒力，极少量病毒即可引起小鼠脑内感染发病。因此通过脑内接种乙脑减毒活疫苗的方法来评价疫苗的神经毒力。

2 材料

- 2.1 供试品。
- 2.2 小鼠：昆明系，17~19日龄，SPF级。
- 2.3 不同规格的试管、吸管、注射器。

3 操作方法

3.1 脑内注射

3.1.1 准备鼠盒，贴好标签，注明试验日期、疫苗批号、惟一标识号、稀释度、注射剂量、途径、注射者。

3.1.2 每批供试品取2支，每支供试品按表示量要求用所附专用稀释液重悬后，将2支供试品混匀即为供试品悬液，放于冰浴中待用。

3.1.3 将供试品悬液接种体重17~19日龄小鼠至少10只，每只脑内注射0.03ml，连续观察14天。接种后3天内死亡者不计（非特异死亡）。但3天内死亡数不得超过20%。

3.2 脑内致病力病毒滴度测定试验 在14天的观察期内如有小鼠发病，应处死无菌取脑，测定病毒毒力，如发现超过2只以上小鼠发病的，应分别对单只小鼠取脑作病毒滴度检测。

3.2.1 特异发病的小鼠无菌取脑，每只小鼠脑加3ml稀释液，用研磨器研磨成脑组织悬液，5000~6000转/分钟离心15分钟，取上清即为 10^{-1} 病鼠脑悬液。再10倍系列稀释至 10^{-4} ，每个稀释度脑内接种17~19日龄小鼠4只，每只接种0.03ml。

3.2.2 同时将 10^{-1} 的病鼠脑悬液皮下注射17~19日龄小鼠10只，每只皮下注射0.1ml，连续观察14天，接种后3天内死亡者不计（非特异死亡）。但3天内死亡数不得超过20%，记录小鼠发病情况。

4 结果计算

发病后小鼠取脑毒力滴定结果，按Reed-Muench法计算。

5 结果判定

5.1 直接脑内注射的结果判定 供试品悬液注射后除确定为非特异死亡的小鼠以外，在14天的观察期内没有出现任何小鼠发病或死亡，判定供试品符合规定，可不必再进行脑内致病力实验。

5.2 病毒毒力测定试验

5.2.1 小鼠脑内毒力应不高于 $3.0\lg LD_{50}/0.03\text{ml}$ 。

5.2.2 皮下注射小鼠观察 14 天，应健存。

起草人：刘欣玉 贾丽丽

复核人：李玉华

冻干乙型脑炎灭活疫苗（Vero 细胞）

简 述

冻干乙型脑炎灭活疫苗（Vero 细胞）系用 Vero 细胞培育的 P3 株乙型脑炎病毒，经培养、收获、灭活病毒、浓缩、纯化后，加入适宜稳定剂冻干制成。有效成分为灭活的 P3 株乙型脑炎病毒。疫苗稀释剂为灭菌注射用水。接种对象 6 月龄~10 周岁儿童和由非疫区进入疫区的儿童和成人。接种本疫苗后，可刺激机体产生抗乙型脑炎病毒的免疫力。用于预防流行性乙型脑炎。规格为复溶后每瓶为 0.5ml。每 1 次人用剂量为 0.5ml。

冻干乙型脑炎灭活疫苗（Vero 细胞）应依据现行版《中国药典》或其他国家药品标准进行测定，并应符合相关要求。

冻干乙型脑炎灭活疫苗（Vero 细胞）的检定内容按照生产阶段分为单次病毒收获液、原液、半成品、成品。其中单次病毒收获液检定主要包括无菌检查、支原体检查、病毒滴定；原液检定主要包括无菌检查、病毒灭活验证试验、蛋白质含量、抗原含量；半成品检定主要包括无菌检查、热原检查等；成品检定主要包括鉴别试验外观、水分、pH 值、渗透压摩尔浓度、游离甲醛含量、效价测定、热稳定性试验、牛血清白蛋白残留量、抗生素残留量、Vero 细胞 DNA 残留量、Vero 细胞蛋白质残留量、无菌检查、异常毒性检查、细菌内毒素检查等。

效价测定法

1 原理

通过腹腔途径将供试品和乙脑灭活疫苗效力试验参考品分别免疫昆明小鼠，刺激机体免疫反应产生抗乙脑病毒的中和抗体，采用噬斑减少中和试验检测其抗体，计算噬斑减少率和 T 值，根据 T 值范围判定疫苗效价。

2 材料和设备

2.1 0.25% 胰蛋白酶（Ty）。

- 2.2 MEM 细胞生长液。
- 2.3 供试品稀释液：含 2% 小牛血清的 pH 7.0~7.6 的水解乳蛋白。
- 2.4 1% 结晶紫染色液。
- 2.5 甲基纤维素覆盖物。
- 2.6 小鼠 (昆明系)，体重 12~14g，清洁级以上。
- 2.7 注射器，应在效期内。
- 2.8 小镊子，确认已灭菌及效期。
- 2.9 各规格移液器的相应吸头：确认已灭菌及效期。
- 2.10 离心管，试管，确认已灭菌及效期。
- 2.11 中和毒株 P3 株。
- 2.12 BHK-21 细胞。
- 2.13 供试品。
- 2.14 乙脑灭活疫苗效力试验参考品；乙脑免疫血清国家参考品 (阳性)；乙脑免疫血清国家参考品 (阴性)。
- 2.15 6 孔细胞培养板/24 孔细胞培养板 (有效期内使用)。
- 2.16 移液器：经过校验合格的 1ml、20~200 μ l、8 道连续式移液器。
- 2.17 CO₂ 培养箱：温度：37 $^{\circ}$ C \pm 1 $^{\circ}$ C，CO₂ 浓度 3%~5%。
- 2.18 2~8 $^{\circ}$ C 普通冰箱。
- 2.19 生物安全柜。
- 2.20 37 $^{\circ}$ C 水浴箱。
- 2.21 离心机。

3 操作方法

3.1 供试品、效力试验参考品的稀释 供试品和参考品应稀释至 1:32。稀释管应置于冰浴中。按以下方法稀释供试品和效力试验参考品。

稀释度：	1:4	1:16	1:32
供试品、效力参考品：	0.5ml	2ml	8ml
加稀释液：	1.5ml	6ml	8ml

稀释全过程样品需保存在冰浴中。

3.2 免疫 第一次免疫：用 1:32 稀释的供试品，腹腔内接种 10~12 只小鼠，0.5ml/只；同时，同法接种两组效力试验参考品 (RA 和 RB)。第二次免疫：自第一次免疫后 7 天，再用 1:32 稀释度的同批供试品和参考品腹腔接种小鼠，0.5ml/只。

3.3 采血 自第二次免疫后 7 天，每只小鼠从眼部采血 0.5~1.0ml，分别收集于 1.5ml 无菌 eppendorf 管，保存在 2~8 $^{\circ}$ C 冰箱过夜。

血清分离、合并和灭活：从每只小鼠分离等量血清 (100~200 μ l) 合并混匀，分装 3~5 管无菌 eppendorf 管，每组不应少于 10 只小鼠血清，56 $^{\circ}$ C 水浴灭活 30 分钟后保存在 -20 $^{\circ}$ C 冰箱备用。

3.4 BHK-21 细胞制备

3.4.1 细胞生长液的配制：配制细胞生长液。

3.4.2 BHK-21 细胞制备: 按照 1:4 至 1:6 的比例准备细胞 (如培养 7 天的 1 瓶 175cm² BHK-21 细胞, 分至 12 个 6 孔板)。弃去 BHK-21 细胞生长液, 加入适量 0.25% 胰蛋白酶, 约 2~5 分钟后弃去, 加入适量细胞生长液吹打分散细胞, 适量加入生长液, 调整细胞浓度至约 $2 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 个细胞/ml, 将细胞悬液接种 6 孔细胞培养板, 每孔 4ml, 37℃ CO₂ 培养箱培养 48 小时, 待细胞长成单层后备用。

3.5 蚀斑减少中和试验

3.5.1 乙脑阳性血清参考品和免疫血清的稀释

3.5.1.1 乙脑阳性血清参考品的稀释 乙脑阳性血清参考品稀释度需依据其中和效价而定, 需包含参考血清中和抗体效价及其前后两个稀释度, 具体稀释方法同免疫血清的稀释。

3.5.1.2 免疫血清的稀释 免疫血清用 1:160 (依据相关标准可作适当调整) 稀释度用于中和实验。

具体稀释方法见下述:

	1:10	1:40	1:160	
血清	0.2ml	0.5ml	0.5ml	1.0ml (取用)
+		+	+	
稀释液	1.8ml	1.5ml	1.5ml	
总量	2ml	2ml	2.0ml	

3.5.2 中和毒的准备: 取 1 支 P3 毒株, 用试管做 10 倍系列稀释至工作浓度 (约 100PFU/0.2ml)。

3.5.3 血清-病毒混合液: 将 1.0ml 病毒液 (约 100PFU/0.2ml) 与 1.0ml 上述稀释血清在 3ml 无菌离心管中混匀。

制备病毒对照: 将 3ml 病毒液 (约 100PFU/0.2ml) 与 3ml 含 2% 牛血清水解乳蛋白混匀。

上述中和试验样品及病毒对照样品均放于 37℃ 水浴中中和 90 分钟。

3.5.4 培养 48 小时的 BHK-21 细胞单层用于接种血清-病毒中和物。吸出细胞培养板中的生长液, 接种血清-病毒中和物 4 孔, 每孔接种 0.4ml; 病毒对照样品接种 10 孔。轻摇培养板以使样品充分接触全部细胞面。37℃ CO₂ 培养箱内吸附 60 分钟, 每 20 分钟轻摇 1 次。

3.5.5 覆盖甲基纤维素。吸附结束后, 加覆盖物于 6 孔培养板中, 每孔 4ml。将培养板放入 37℃ 5% CO₂ 培养箱中, 继续培养 5 天。

3.5.6 染色吸出覆盖物, 加入染色液, 每孔 1~2ml, 室温静置 20~30 分钟后, 弃去染色液。用流动水冲洗 1 分钟即可计数蚀斑。

4 计算

计算供试品平均蚀斑数 = $(a+b+c+d) / 4$

计算效力参考品平均蚀斑数 A 组 = $(a+b+c+d) / 4$

B 组 = $(a+b+c+d) / 4$

计算病毒对照平均蚀斑数 = $(1+2+3+4+5+6+7+8+9+10) / 10$

供试品及效力试验参考品 T 值, 计算:

$$T = (Y - 50) / 47.762 + \lg X$$

式中 T 为中和指数, Y 为供试品或效力试验参考品的蚀斑减少率, X 为蚀斑中和试验所用的血清稀释倍数。

5 结果与判定

下列 2 项必须成立, 方能判定供试品效力试验结果。

- 5.1 病毒对照平均斑数应在 50~150 之间 (最好在 100 ± 10)。
- 5.2 阳性血清参考品的效价和效力试验疫苗参考品 T 值应在标示范围内。

6 注意事项

- 6.1 小鼠免疫过程中, 免疫量应准确, 防止漏出。
- 6.2 采血量应足够, 并防止溶血。
- 6.3 BHK-21 细胞生长状态应良好。

起草人: 徐宏山 贾丽丽

复核人: 李玉华

宿主细胞蛋白质残留量测定法

1 原理

宿主细胞蛋白质 (HCP) 残留是指乙脑灭活疫苗中含有的宿主细胞的蛋白质成分。通常采用 ELISA 法测定制品中 HCP 的残留量。

把具有免疫活性的 HCP 特异性抗体结合到某种固相载体上, 将供试品与酶标抗体按不同的步骤与固相载体上的抗体进行免疫反应后, 加入酶标反应底物, 底物被酶催化产生的有色产物的量与供试品中 HCP 的量直接相关。特定波长下测定有色产物的 OD 值, 以 HCP 标准品含量与对应的吸光度 (OD 值) 形成标准曲线, 根据供试品 OD 值进行 HCP 的定量分析。

2 材料和设备

- 2.1 材料和试剂 酶标抗体、HCP 标准抗原、对照品、稀释液、洗液、底物液及终止液等 ELISA 常规试剂; 96 孔酶联反应板、加液槽、吸水纸、移液器及相应 Tip 头等。
- 2.2 设备 恒温水浴箱、酶标仪。

3 操作方法

- 3.1 将宿主蛋白残留量 ELISA 检测试剂和供试品平衡至室温。
- 3.2 标准品反应 HCP 标准抗原, 按其蛋白浓度由低到高加至包被好的酶标板, 每个浓度做 2 孔。对照品也按照说明书要求复溶后, 加至包被好的酶标板。
- 3.3 供试品/对照品反应 将供试品用稀释液稀释至标准曲线范围内的相应浓度, 加至酶标板, 每个稀释度做 2 孔; 同时加入阴性对照和空白对照各 2 孔, 封板, 将加有供试品的 ELISA 板置于相应温度, 温浴相应时间。
- 3.4 酶标抗体的孵育 洗板 5 次后, 将酶标抗体加入酶标板, 封膜, 将 ELISA 板置于相应温度, 温浴相应时间。

3.5 显色 洗板后,将底物液加入板中显色,封膜后,按说明书置于相应条件温浴相应时间。

3.6 终止及比色 显色结束后,加入终止液终止反应。置于酶标仪,按说明书规定波长进行吸光值测定。

4 计算

以 HCP 标准品的浓度及其对应的吸光度值,按照说明书规定的分析方法,确定标准曲线;将吸光度值代入标准方程,得出供试品中 HCP 残留量;供试品的 HCP 浓度 = 方程计算结果 × 相应稀释倍数。

5 结果与判定

5.1 根据检测试剂要求,标准曲线的 R^2 值、对照品浓度均应符合要求,试验成立。

5.2 试验成立,方可计算供试品 HCP 残留量浓度。

5.3 按照质量标准规定,对供试品的检定结果进行判定。

6 注意事项

6.1 试验开始前,应将检测试剂和供试品平衡到室温。

6.2 严格按照检测试剂说明书进行操作。

6.3 酶标仪应提前开启预热。

6.4 应尽可能取吸光度在标准曲线中间位置,且以低稀释度的吸光度计算供试品的 HCP 残留量。

起草人:王玲

复核人:李玉华

Vero 细胞 DNA 残留量测定法

1 原理

供试品中的外源性 DNA 经变性为单链后吸附于固相膜上,在一定条件下可与相匹配的单链 DNA 复性而重新结合成为双链 DNA,称为杂交。将特异性单链 DNA 探针标记后,与吸附在固相膜上的供试品单链 DNA 杂交,并使用与标记物相应的显示系统显示杂交结果,与已知含量的阳性 DNA 对照比对后,可测定供试品中外源性 DNA 残留量。本检测法适用于 Vero 细胞培养的病毒性疫苗制品,用于检测以 Vero 细胞为生产基质生产的疫苗中宿主 DNA 残留量检测。

2 材料和设备

2.1 DNA 探针标记和检测试剂盒。

2.2 DNA 杂交膜:阳离子尼龙膜。

2.3 2%蛋白酶 K:配制 50mmol/L Tris-Cl (pH 8.0) 和 1.5mmol/L 醋酸钙溶液 100ml,称取蛋白酶 K 2.0g,充分溶解,分装后储藏于 -20°C 备用,勿反复冻融。

2.4 1.0mol/L 三羟甲基氨基甲烷 (Tris) 溶液 (pH 8.0):用盐酸调 pH 值至 8.0,高压

蒸汽灭菌。

2.5 0.5mol/L 乙二胺四乙酸二钠溶液 (pH 8.0): 用 10mol/L NaOH 调节 pH 至 8.0, 高压蒸汽灭菌。

2.6 20% 十二烷基硫酸钠 (SDS) 溶液: 用浓盐酸调 pH 至 7.20, 高压后室温保存。

2.7 3.0mol/L 醋酸钠溶液: 取 800ml 双蒸水溶解 408.3g 三水醋酸钠, 用冰乙酸调 pH 值至 5.0, 定容至 1L, 过滤除菌后分装备用。

2.8 10× 蛋白酶缓冲液 (pH 8.0)

1mol/L Tris	溶液 (pH 8.0)	1.0ml
0.5mol/L EDTANa ₂	溶液 (pH 8.0)	2.0ml
20% SDS	溶液 (pH 7.2)	2.5ml
加灭菌双蒸水至		10ml

2.9 TE 缓冲液 (pH 8.0): 量取 1mol/L Tris 溶液 (pH 8.0) 10ml, 0.5mol/L 乙二胺四乙酸二钠溶液 (pH 8.0) 2ml, 加灭菌水至 1000ml, 4℃ 保存。

2.10 Buffer I: 11.6g 顺丁烯二酸, 8.76gNaCl, 固体 NaOH 调 pH 至 7.5 后, 定容至 1L

2.11 Buffer II: 7.88gTris-HCl, 2.93gNaCl, 5.08gMgCl₂, 1mol/L NaOH 调 pH 至 9.5, 定容至 500ml。

2.12 20× SSC: 88.2g 柠檬酸钠, 175.3gNaCl, 浓盐酸调 pH 至 7.0, 定容至 1L, 高压后 4℃ 保存。

2.13 Tris 饱和酚。

2.14 Vero 细胞 DNA 定量国家参考品 (限杂交法)。

2.15 试验用具: 恒温金属浴、冷冻离心机、超低温冰箱、紫外交联仪、杂交混悬仪、水平摇床。

3 操作方法

3.1 探针标记

3.1.1 变性: 取适量探针标记用 Vero 细胞 DNA (2μg, 超声处理, 片段大小在 100~1000bp 之间), 用去离子水补足至 16μl, 置 100℃ 水浴加热 10 分钟, 迅速冰浴冷却, 以每分钟 8000 转离心 5 秒。

3.1.2 标记: 加入试剂盒提供的随机引物 4μl, 混匀, 37℃ 过夜。

3.1.3 终止及沉淀: 0.5mol/L 乙二胺四乙酸二钠溶液 (pH 8.0) 3μl 终止反应, 并加入 3mol/L 醋酸钠溶液 2μl, -20℃ 预冷无水乙醇 300μl, -70℃ 以下作用 2 小时。

3.1.4 洗涤: 15000g 低温离心 15 分钟, 弃上清, -20℃ 预冷 75% 乙醇溶液 600μl 洗涤沉淀 1 次。

3.1.5 离心: 15000g 低温离心 20 分钟, 弃上清。

3.1.6 复溶: 室温吹干, 加 100μl TE 缓冲液溶解。

3.2 测定法

3.2.1 蛋白酶 K 预处理: 按表 1 对 Vero 细胞 DNA 参考品和供试品进行加样, 混和后 37℃ 保温 2 小时。

表 1 参考品/供试品处理加样量

样 本	加样量	2%蛋白酶 K 溶液	蛋白酶抑制剂	去离子水
DNA 参考品	500 μ l	5 μ l	60 μ l	35 μ l
供试品	500 μ l	5 μ l	60 μ l	35 μ l

注：样品的稀释，选用成品标示剂量，若规格为 1.0ml/剂的制品应分两管加样。

3.2.2 DNA 抽提及沉淀：加入饱和酚溶液 600 μ l，剧烈混合 15~30 秒，15000g 离心 10 分钟；小心移取上层液体至一干净离心管中，加入 3mol/L 醋酸钠溶液 60 μ l，充分混合，再加入 -20℃ 预冷异丙醇 600 μ l，-20℃ 过夜；15000g 低温离心 15 分钟，弃上清液，-20℃ 预冷的 75% 乙醇溶液 500 μ l 洗涤沉淀；15000g 低温离心 15 分钟，弃上清液，室温通风干燥（或 65℃ 干燥 30 分钟）；加 100 μ l TE 缓冲液溶解（参考品采用 200 μ l TE 溶解）。

3.2.3 点膜：将 DNA 参考品、上述提取供试品及探针置 100℃ 水浴加热 10 分钟，迅速置冰浴冷却，以每分钟 8000 转离心 5 秒；将 DNA 参考品用 TE 缓冲液进行 10 倍系列稀释，使其终浓度分别为 10ng/100 μ l、1ng/100 μ l、100pg/100 μ l、10pg/100 μ l、1pg/100 μ l；取杂交膜浸润于 TE 缓冲液中，检查杂交膜完整性，然后组装抽滤加样器；无尘环境下将 100 μ l 参考品、供试品和阳性参考品全部点样；杂交膜置 TE 缓冲液浸润的滤纸上，紫外交联（根据紫外交联仪功率适当调整时间和距离）。

3.2.4 杂交与显色：预杂交，取无菌培养皿，加适量已 45℃ 预热的杂交液，将杂交膜全部浸泡于其中，放于 45℃、10 转/分钟杂交仪中预杂交 30 分钟；杂交，弃预杂交液，加入适量新鲜预热杂交液（45℃）及全部探针，45℃ 杂交过夜；高盐洗脱：取无菌培养皿，适量 2 \times SSC（0.1%SDS），将杂交膜全部浸泡于其中室温下，置水平脱色摇床，5 分钟（10 转/分钟），2 次；低盐洗脱，取无菌培养皿，加适量 0.5 \times SSC（0.1%SDS），置 45℃、杂交仪（10 转/分钟），洗脱 15 分钟，1 次；平衡，取无菌培养皿，加适量 Buffer I，将杂交膜全部浸泡于其中，室温下 5 分钟（10 转/分钟）；抗体孵育，取无菌培养皿，加适量封闭液，将杂交膜全部浸泡于其中，室温 30 分钟（10 转/分钟），弃封闭液，加入新鲜封闭液，同时加入抗体，60 分钟（10 转/分钟）；洗脱，取无菌培养皿，加适量 Buffer I（0.1%吐温 20），将杂交膜全部浸泡于其中，室温 15 分钟（10 转/分钟），2 次；平衡，取无菌培养皿，加适量 Buffer II，将杂交膜全部浸泡于其中，室温下 5 分钟（10 转/分钟）；显色，取无菌培养皿，加适量 Buffer II、NBT（5#，1:200），将杂交膜全部浸泡其中，室温下避光静置至显色完毕（时间不得超过 4 小时）；终止反应，将杂交膜置 TE 溶液 5 分钟，湿膜扫描或拍照、风干并封膜。

4 结果与判定

将供试品与 DNA 参考品进行比较，根据显色的深浅判定供试品中外源性 DNA 的含量。

5 注意事项

DNA 参考品应显色，其颜色深度与 DNA 含量相对应，10 倍稀释显色点应呈一定的颜色梯度，且检测灵敏度应不低于 10pg 的检测限。

起草人：李加

复核人：李玉华

森林脑炎灭活疫苗

简 述

森林脑炎 (Forest encephalitis) 又名蜱传脑炎 (Tick-borne encephalitis, TBE), 是由森林脑炎病毒 (Tick-borne encephalitis virus, TBEV) 所致的一种以入侵中枢神经系统为主的急性传染病。其主要临床特征表现为高烧、头痛、脑神经麻痹、意识障碍、四肢瘫痪或肌肉扭曲等症状, 致死率高达 20%~30%, 潜伏期在 5~28 天左右, 病程前期先出现萎靡、头痛、发热, 偶有腹痛。

1910 年, 在苏联远东地区发现了以中枢神经病变为主要特征的急性传染病, 被认为是最早对森林脑炎的报道。1952 年, 我国科学工作者从病人脑组织中分离出 TBEV, 并证明为前苏联远东型病毒, 用于森林脑炎灭活疫苗的研发。

我国人间传染的病原微生物名录将其定为危害程度为第一类的高风险微生物, 病毒培养、动物感染实验和未经培养的感染材料操作均需在生物安全三级实验室进行。

疫苗的有效成分为灭活的森林脑炎病毒, 接种疫苗后, 可刺激机体产生抗森林脑炎病毒的抗体。辅料成分包括人血白蛋白、硫柳汞、氢氧化铝、磷酸缓冲盐等。我国最早森林脑炎疫苗的质量标准收录在《中国生物制品规程》1985 年版中, 至现行版《中国药典》均有收录。

在疫苗的质量控制中, 着重对安全性、有效性等相关指标进行考察, 在细胞基质、毒种、病毒收获、病毒灭活工艺、抗原纯化、半成品配制、成品检定等全生命周期的质量控制点进行监测。其中原液检定包括无菌检查、抗原含量、蛋白质含量、牛血清白蛋白残留量、小鼠肾细胞蛋白残留量等; 半成品检定包括无菌检查。成品检定分为鉴别试验, 根据效价测定结果判定; 物理检查主要包括外观、装量、渗透压摩尔浓度; 化学检查主要包括 pH 值、游离甲醛含量、硫柳汞含量、氢氧化铝含量; 效价测定; 热稳定性试验; 抗生素残留量; 无菌检查; 异常毒性检查和细菌内毒素检查等。尤其关注有效性试验中的效价测定, 安全性试验中的细菌内毒素、无菌和异常毒性, 以及疫苗生产过程中引入的杂质去除率或残留量考察等。

效价测定法

我国森林脑炎灭活疫苗的效价测定方法为我国自主创建, 是以对森林脑炎病毒免疫机制的研究结果为依据的。

1 原理

森林脑炎灭活疫苗免疫小鼠后可使小鼠产生抗体, 从而抑制 TBEV 对小鼠的感染, 通过计算试验组和对照组小鼠在 TBEV 攻击下的半数致死量, 来推算疫苗保护力, 以判定疫苗是否有效, 同时判定疫苗是否为森林脑炎疫苗。

2 材料

2.1 材料

2.1.1 小鼠：清洁级以上的健康小鼠。

2.1.2 毒株：“森张”株。

2.2 溶液

2.2.1 供试品：森林脑炎灭活疫苗。

2.2.2 稀释液：pH 7.8±0.2 的营养肉汤培养基。

3 操作方法

3.1 分组 将小鼠分组，每批供试品用 30 只小鼠，按攻击毒的不同稀释度，随机分为 5 组；同时领取 30 只作为对照组。试验组和对照组在同一条件下饲养。

3.2 免疫 分别于第 0、第 7 天免疫，每只于腹腔免疫 0.3ml 供试品。

3.3 攻击毒制备 将病毒悬液进行 10 倍系列稀释，病毒悬液的稀释过程都应在冰浴中进行。

3.4 攻击 首次免疫后两周用稀释好的毒种进行腹腔攻击，每个稀释度攻击 6 只小鼠，每只 0.3ml。

观察动物发病，死亡情况，并做记录。自攻击日起观察 21 天，三日内死亡者不应计入结果。

4 结果计算

根据小鼠死亡数量，采用 Reed-Muench 法计算试验组与对照组的 $\lg LD_{50}/0.3ml$ ，对照组 $\lg LD_{50}/0.3ml$ 减去试验组 $\lg LD_{50}/0.3ml$ 所得结果的反对数即为免疫保护指数。

5 结果判定

对照组病毒毒力的 $\lg LD_{50}/0.3ml \geq 7.5$ 时，此次试验成立，免疫保护指数达到 500000 以上，判定供试品合格同时证明供试品为森林脑炎疫苗。

不合格可复试一次，复试不合格，则供试品不合格。对照组病毒毒力的 $\lg LD_{50}/0.3ml$ 低于 7.5 可复试，不计入复试次数。

6 注意事项

6.1 为防止病毒滴度下降对试验结果的影响，攻毒操作时间应不得超过 2 小时，且关于毒种悬液的操作必须置于冰浴内进行。

6.2 攻毒后的动物应按攻毒动物管理制度执行，对死亡动物和所使用的垫料、食物、水源等材料必须先高压蒸汽灭菌或消毒液处理，再进行后续处理。

6.3 所有实验需要在生物安全三级实验室完成，对所用材料必须进行高压蒸汽灭菌或消毒液处理。

6.4 腹腔免疫和攻击病毒时，需注意不要有液体遗漏。

起草人：刘晶晶

复核人：李玉华

黄热减毒活疫苗

简 述

黄热病是由黄热病毒（Yellow Fever Virus, YFV）引起的一种自然疫源性传染病，在中、南美洲和非洲大陆热带地区呈地方性和间歇性流行。全球现有约 45 个非洲和南美洲国家的总计超过 9 亿人口处于黄热病疫区内，每年约发生黄热病病例 20 万。2016 年，我国更是首次出现了 11 例输入型黄热病例。

黄热病没有有效的治疗手段，接种疫苗是目前唯一经济有效的黄热病防治措施。17D 疫苗是世界范围内广泛使用的也是唯一的黄热病疫苗，三个亚株 17DD、17D-204 和 17D-213 分别被不同国家作为原始毒种，用于生产黄热减毒活疫苗。黄热减毒活疫苗已有超过 70 年的使用历史，一针免疫保护率可达 95% 以上，且免疫持久性至少在 10 年以上，并具有良好的安全性。

我国黄热减毒活疫苗生产厂家只有北京北生研生物制品有限公司，生产工艺较为简单，为黄热病毒 17D-204 减毒株接种鸡胚卵黄囊，培养后收获鸡胚组织，研磨、低速离心、收获上清，加入稳定剂，冻干制成。

黄热减毒活疫苗生产遵守 GMP 原则，质量控制涉及疫苗生产的全过程。

细胞基质和毒种是疫苗生产最基本、最重要的材料，其质量的可靠性直接关系到疫苗的质量。用于培养病毒的鸡胚必须来自封闭的无特定病原体（Specific Pathogen Free, SPF）鸡群。生产用毒种须历史来源清晰、传代减毒过程明了、减毒效果和免疫原性经由临床人体观察证实，且必须采用病毒种子批系统，即原始种子批、主种子批和工作种子批。《中国药典》2015 年版三部，要求主种子批进行鉴别试验、病毒滴度、无菌检查、分枝杆菌检查、支原体检查、外源病毒因子检查、外源性禽腺病毒检测、猴体试验（包括嗜内脏性试验、嗜神经性试验和免疫原性检查）。工作种子批则至少应进行鉴别、病毒滴度、无菌、分枝杆菌、支原体、外源病毒因子、外源性禽腺病毒的检测。除此之外，在这一版药典中，第一次要求“新制备的种子批用于生产时，连续制备的前三批疫苗原液应进行病毒关键基因序列测定，测定结果应与主种子批保持一致”。

根据黄热减毒活疫苗生产工艺的特点，黄热减毒活疫苗的质量控制包括对单一病毒收获物、原液、半成品和成品的质量控制。单一病毒收获物检定包括无菌检查；原液检定包括病毒滴度、无菌检查、支原体检查、蛋白氮含量测定；半成品检定包括无菌检查；成品检定包括鉴别试验、外观、pH、水分、渗透压摩尔浓度、病毒滴度、热稳定性试验、无菌检查、异常毒性检查、残留卵清蛋白含量、细菌内毒素含量。

鉴别试验

1 原理

病毒的复制需要宿主细胞提供原料、能量和复制场所，因此病毒必须在活的细胞内复制增

殖。病毒吸附于敏感细胞的表面，通过穿入、脱壳，侵入细胞，进行病毒复制和装配，并引起细胞病变。特异性的抗病毒抗体（中和抗体）与病毒结合后，使病毒失去吸附、穿入宿主细胞的能力，从而阻止了病毒在宿主细胞内的复制，降低病毒感染引起的细胞病变效应。

将定量的黄热病毒分别与黄热病毒特异性免疫血清、非黄热病毒特异性血清中和，和与非黄热病毒特异性免疫血清中和后的病毒量相比，与黄热病毒特异性免疫血清中和后，具有感染性的黄热病毒含量降低，感染细胞形成的空斑数减少。

2 材料和设备

2.1 材料 细胞培养板、细胞培养瓶、吸管、不同量程移液器、移液枪头等。

2.2 设备 普通光学显微镜、细胞计数仪、生物安全柜、二氧化碳培养箱等。

2.3 试剂 胎牛血清、MEM 培养基、双抗、谷氨酰胺（3%）、 NaHCO_3 （7.5%）、水、甲甲基纤维素（2%）、胰酶、抗黄热病毒特异性免疫血清、结晶紫染色液等。

3 操作方法

3.1 细胞准备 Vero 细胞传代长成致密单层后，弃去培养液，加入适量 0.25% 胰酶，约 2~5 分钟后弃去胰酶，再加入适量细胞生长液用吸管吹打并均匀分散细胞，按 1:3 的比例加入生长液传代，接种到细胞培养瓶中。37℃ 培养 4~5 天后同法制备细胞悬液至细胞浓度约为 $0.8 \times 10^5/\text{ml}$ ，接种 6 孔细胞培养板，每孔 4ml，37℃ 5% 二氧化碳培养箱中培养，细胞长成单层时即可接种病毒。

3.2 中和试验 将供试品按标示量复溶后，根据病毒滴度做相应的倍比稀释，使病毒对照组病毒量在每孔 50~100 个蚀斑。将稀释好的供试品分别与特异免疫血清和非免疫血清等量混合，置 37℃ 5% 二氧化碳培养箱内中和 60 分钟。

3.3 接种 吸去细胞板中的细胞培养基，将中和后混合物接种于 6 孔板中，每孔 0.4ml，接种 2 孔。细胞对照孔，补加 0.4ml 细胞维持液。后将细胞板置于 37℃ 5% 二氧化碳培养箱内吸附 90 分钟。

3.4 加覆盖物 加甲基纤维素覆盖物于 6 孔板中，4ml/孔，37℃ 二氧化碳培养箱继续培养 7 天。

3.5 染色 吸出 6 孔板中的覆盖物，加结晶紫染色液 1ml，15~20 分钟后弃去染色液，用流水冲洗，即可观看结果。

4 结果计算

计数每孔的蚀斑数，分别计算免疫血清组、非免疫血清组、细胞对照组的平均蚀斑数。

5 结果判定

免疫血清组的蚀斑数比非免疫血清组的减少率应不低于 80%。

6 注意事项

6.1 本操作细则由具有此项目上岗资质的检验人员负责执行。

6.2 单层细胞一定要均匀，形态和状态良好。

- 6.3 试验所用培养基应现用现配。
- 6.4 非免疫血清组蚀斑数、细胞对照组蚀斑数均符合规定，试验方成立。
- 6.5 试验过程中所用细胞培养板、枪头等，均需高压灭菌后，按医疗废物处理。

起草人：王玲

复核人：李玉华

病毒滴度测定法

1 原理

适当稀释的病毒悬液接种于长成单层的宿主细胞，再在细胞上覆盖甲基纤维素，由于半固体介质的限制，病毒只能感染并破坏临近的细胞，造成细胞溶解而形成空斑，空斑形成后，经结晶紫染色，活细胞显示蓝色，而空斑区细胞不着色，形成不染区域，即为肉眼可见的空斑。每个空斑由一个病毒颗粒造成。计数空斑数量，再乘以相应的稀释倍数即可得知供试品的病毒感染滴度。

2 材料和设备

- 2.1 材料 细胞培养板、细胞培养瓶、吸管、不同量程移液器、移液枪头等。
- 2.2 设备 普通光学显微镜、细胞计数仪、生物安全柜、二氧化碳培养箱等。
- 2.3 试剂 胎牛血清、MEM 培养基、双抗、谷氨酰胺（3%）、 NaHCO_3 （7.5%）、水、甲基纤维素（2%）、胰酶、结晶紫染色液等。

3 操作方法

3.1 细胞准备 Vero 细胞传代长成致密单层后，弃去培养液，加入适量 0.25%胰酶，约 2~5 分钟后弃去，再加入适量细胞生长液用吸管吹打并均匀分散细胞，按 1:3 的比例加入生长液传代，接种到细胞培养瓶中。37℃ 培养 4~5 天后同法制备细胞悬液至细胞浓度约为 $0.8 \times 10^5/\text{ml}$ ，接种 6 孔细胞培养板，每孔 4ml，37℃ 5% CO_2 培养箱中培养，细胞长成单层时即可接种病毒。

3.2 供试品准备 取 3 瓶供试品，按标示量用稀释液复溶后合并。将样品做 4 倍系列稀释。

3.3 国家标准品的准备 取 1 支国家标准品，按标示量用稀释液复溶，将样品做 4 倍系列稀释。

3.4 接种 吸去细胞板中的细胞培养基，选取 3 个稀释度的供试品和国家标准品，分别接种于 6 孔板中，每孔 0.4ml，每稀释度接种 2 孔。细胞对照孔，补加 0.4ml 细胞维持液。后将细胞板置于 37℃ 5% 二氧化碳培养箱箱内吸附 90 分钟。

3.5 加覆盖物 加甲基纤维素覆盖物于 6 孔板中，4ml/孔，37℃ 二氧化碳培养箱继续培养 7 天。

3.6 染色吸出 6 孔板中的覆盖物，加结晶紫染色液 1ml，15~20 分钟后弃去染色液，用流水冲洗，即可观看结果。

4 结果计算

记录每个稀释度的蚀斑数，出斑数在 30 以内的稀释度的平均斑数 \times 稀释倍数 $\times 2.5$ ，再取对数，即为病毒滴度。

5 结果判定

- 5.1 国家标准品的病毒滴度应符合说明书中滴度要求，试验成立。
- 5.2 试验成立，方可计算供试品的病毒滴度，病毒滴度应不低于 4.5lgPFU/ml。

6 注意事项

- 6.1 本操作细则由具有此项目上岗资质的检验人员负责执行。
- 6.2 单层细胞一定要均匀，形态和状态良好。
- 6.3 应于冰浴上稀释供试品，不同稀释度的供试品稀释应更换枪头。
- 6.4 试验所用培养基应现用现配。
- 6.5 试验过程中使用过的细胞培养板、枪头等，均需高压灭菌后，按医疗废物处理。

起草人：王玲

复核人：李玉华

重组人胰岛素

简 述

重组人胰岛素 (Recombinant Human Insulin) 是第一个上市的重组蛋白质类药物。人胰岛素的 A 链有 21 个氨基酸, B 链有 30 个氨基酸, 其中 A7 (Cys) - B7 (Cys)、A20 (Cys) - B19 (Cys) 四个半胱氨酸中的巯基形成两个二硫键, 使 A、B 两链连接起来, A 链中 A6 (Cys) 与 A11 (Cys) 之间形成一个二硫键。重组人胰岛素的主要活性是调节葡萄糖代谢, 通过刺激外周葡萄糖摄取、抑制肝葡萄糖生成, 而降低血糖水平; 胰岛素抑制脂肪细胞内的脂质分解, 抑制蛋白水解和增强蛋白质合成。胰岛素及其类似物是目前全世界临床医生治疗糖尿病最主要的药物。目前已上市的重组人胰岛素及其类似物主要有大肠埃希菌和酵母两种表达体系, 其原料主要的生产方式有两种。

重组人胰岛素及其制剂主要包括重组人胰岛素原料、重组人胰岛素注射液、精蛋白重组人胰岛素注射液、精蛋白重组人胰岛素混合注射液等。重组人胰岛素的检定内容按照生产阶段分为原料、半成品、制剂。其中原料检定主要包括性状、RP-HPLC 鉴别、肽图鉴别、有关物质、高分子蛋白质、锌含量、干燥失重、炽灼残渣、微生物限度、细菌内毒素、宿主蛋白残留、宿主 DNA 残留、残余抗生索活性、体内动物活性、N 末端氨基酸序列分析、单链前体、HPLC 含量测定等; 半成品检定主要包括无菌检查、细菌内毒素检查等; 制剂检定按照不同剂型, 一般分为液相鉴别、抑菌剂鉴别、pH 值、有关物质、高分子蛋白、锌、抑菌剂含量、上清中胰岛素含量、可溶性胰岛素、不溶性微粒、装量、可见异物、无菌、细菌内毒素、HPLC 含量测定等。重组人胰岛素原料及制剂检定涉及到的特异性检测方法包括肽图鉴别、晶形镜检、有关物质、高分子蛋白质、上清液中的重组人胰岛素、可溶性重组人胰岛素、胰岛素生物活性、含量测定, 具体描述如下。

肽图鉴别法

1 原理

肽图分析是根据蛋白质、多肽的分子量大小以及氨基酸组成特点, 使用专一性较强的蛋白水解酶作用于特殊的肽链位点将多肽裂解成小片断, 采用一定的分离检测手段形成特征性指纹图谱, 通过与对照品肽图相比较对蛋白质供试品进行鉴别。肽图分析对多肽结构研究和特性鉴别具有重要意义。利用 V8 蛋白酶能专一性裂解 Glu 的羧基端肽键的特点, 将位于重组人胰岛素分子 A 链的第 4、17 和 B 链的第 13 和 21 位点的 4 个 Glu 的羧基端肽键裂解, 由于 A、B 链之间两对二硫键的作用, 重组人胰岛素分子用 V8 酶裂解后形成 4~5 个主要肽段, 然后通过 RP-HPLC 法检测, 获得其特征性肽图谱。

2 材料和设备

2.1 仪器设备 温浴系统、高效液相色谱仪。

2.2 材料和试剂

2.2.1 试剂及溶液 三羟甲基氨基甲烷(Tris)(分析纯)、无水硫酸钠(分析纯)、磷酸(分析纯)、三氟乙酸(分析纯)、乙醇胺(分析纯)、盐酸(分析纯)、乙腈(色谱纯)、V8蛋白酶、重组人胰岛素对照品。

0.2mol/L Tris-HCl 缓冲液: 称取 2.42g Tris, 加 100ml 超纯水溶解, 用浓盐酸调 pH 值为 7.3。

0.1%的三氟乙酸溶液: 精密量取三氟乙酸 1ml, 加水至 1000ml。

0.2mol/L 硫酸盐缓冲液: 称取无水硫酸钠 28.4g, 加水溶解后, 加磷酸 2.7ml、水 800ml, 用乙醇胺调节 pH 值至 2.3, 加水至 1000ml, 混匀, 即得。

0.1%V8 蛋白酶溶液: 精密称取 V8 蛋白酶 0.1mg, 加水 100ml 溶解, 混匀。流动相 A 液: 0.2mol/L 硫酸盐缓冲液(pH 2.3)-乙腈(90:10)。

流动相 B 液: 乙腈-水(50:50)。

2.2.2 材料 十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂, 如: Vydac C18 柱, 250mm×4.6mm, 粒度 5 μ m 或其他适宜的色谱柱。

3 操作方法

3.1 样品制备 精密称取供试品 10mg, 加入 0.1%三氟乙酸溶液 1ml 溶解, 混匀。取 20 μ l, 加 0.2mol/L Tris-HCl 缓冲液 20 μ l、0.1%V8 酶溶液 20 μ l 与水 140 μ l, 混匀, 置 37 $^{\circ}$ C 水浴中 2 小时后, 加磷酸 3 μ l, 作为供试品溶液; 另取重组人胰岛素对照品适量, 同法制备, 作为对照品溶液。

3.2 检测 色谱条件: 柱温为 40 $^{\circ}$ C; 进样器温度为 2~8 $^{\circ}$ C; 流速为 1ml/min; 检测器为紫外检测器; 检测波长为 214nm; 进样体积 25 μ l。按下表进行梯度洗脱, 记录供试品溶液及对照品溶液的色谱图。

时间(分钟)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0	90	10
5	80	20
45	40	60
50	40	60

4 结果判定

4.1 系统适用性要求: 片段 II 与片段 III 之间的分离度应不小于 3.4。

4.2 合格标准: 供试品溶液的肽图谱应与对照品溶液的肽图谱一致。

5 注意事项

注意酶切温度及酶切时间，以确保主峰酶切完全。

起草人：王绿音 丁晓丽

复核人：梁成罡 张慧

晶形镜检法

1 原理

精蛋白重组人胰岛素注射液及混合胰岛素注射液中晶体形状、大小，作为性状项目列入注射液质量标准。生物显微镜是利用凸透镜的放大成像原理，将晶体放大到人眼能分辨的尺寸，并使用适宜的软件进行拍照并测量晶体的长度。生物显微镜总放大倍数 = 物镜倍数 × 中继透镜的倍数 × 数码放大倍数。

2 材料和设备

2.1 仪器设备 生物显微镜、计算机。

2.2 材料和试剂 盖玻片、载玻片、一次性吸头、移液枪。

3 操作方法

分别取精蛋白重组人胰岛素注射液或精蛋白重组人胰岛素混合注射液，颠倒混匀，用移液器分别吸取约 50 μ l 滴在载玻片上，小心盖上盖玻片，于生物显微镜下观察，并使用适宜的软件进行拍照并测量晶体的长度。

4 结果判定

合格标准：晶体呈棒状，绝大多数晶体不得小于 1 μ m，不得大于 60 μ m，无聚合体存在。

5 注意事项

5.1 供试品测定前需混合均匀。

5.2 生物显微镜镜头表面必须保持清洁。

起草人：丁晓丽 吕萍

复核人：梁成罡 张慧

有关物质检查法

1 原理

有关物质包括由其生产工艺或原辅料带入的工艺杂质、或在贮存过程中产生的降解杂质，其分析方法应专属、灵敏，使主成分与有关物质能有效分离，且检测限及定量限应能满足相应

的要求。重组人胰岛素原料及制剂中的有关物质，主要包括 A₂₁ 脱氨人胰岛素及其他有关物质，影响重组人胰岛素的有效性 & 稳定性。采用 RP-HPLC 方法，使 A₂₁ 脱氨人胰岛素及其他有关物质与主成分达到有效分离，并采用面积归一化法对其进行定量。

2 材料和设备

2.1 仪器设备 温浴系统、高效液相色谱仪。

2.2 材料和试剂

2.2.1 试剂及溶液 无水硫酸钠（分析纯）、乙醇胺（分析纯）、盐酸（分析纯）、磷酸（分析纯）、乙腈（色谱纯）、重组人胰岛素对照品。

0.2mol/L 硫酸盐缓冲液：称取无水硫酸钠 28.4g，加水溶解后，加磷酸 2.7ml、水 800ml，用乙醇胺调节 pH 值至 2.3，加水至 1000ml，混匀，即得。

0.01mol/L 盐酸溶液：取盐酸 83μl，加水稀释至 100ml，混匀，即得。

9.6mol/L 盐酸溶液：取盐酸 8ml，加水稀释至 10ml，混匀，即得。

流动相 A 液：0.2mol/L 硫酸盐缓冲液（pH2.3）-乙腈（82:18）。

流动相 B 液：乙腈-水（50:50）。

2.2.2 材料 十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂，如：Vydac C18 柱，250mm×4.6mm，粒度 5μm 或其他适宜的色谱柱。

3 操作方法

3.1 样品制备

3.1.1 系统适用性溶液：称取重组人胰岛素对照品 10mg，加入 0.01mol/L 盐酸溶液溶解并稀释定容至 10ml，室温放置至少 24 小时，作为系统适用性溶液。

3.1.2 原料：精密称取供试品 17.5mg，加入 0.01mol/L 盐酸溶液溶解并稀释定容至 5ml，混匀，作为供试品溶液。

3.1.3 注射液（包括重组人胰岛素注射液、精蛋白重组人胰岛素注射液及精蛋白重组人胰岛素混合注射液）：取本品，每 1ml 中加 9.6mol/L 盐酸溶液 3μl，作为供试品溶液。

3.2 检测 色谱条件：柱温为 40℃；进样器温度为 2~8℃；流速为 1ml/min；检测器为紫外检测器；检测波长为 214nm；进样体积：原料为 20μl，注射液为约相当于重组人胰岛素 70μg。按下表进行梯度洗脱，记录色谱图。

时间/分钟	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0	78	22
36	78	22
61	33	67
67	33	67

4 结果判定

4.1 系统适用性要求

4.1.1 调节流动相比比例使重组人胰岛素主峰的保留时间约为 25 分钟。

4.1.2 重组人胰岛素峰与 A₂₁ 脱氨人胰岛素峰（与重组人胰岛素峰的相对保留时间约为 1.3）的分离度不小于 1.8，拖尾因子不大于 1.8。

4.2 合格标准

4.2.1 原料：按峰面积归一化法计算，A₂₁ 脱氨人胰岛素不得过 1.5%，其他杂质峰面积之和不得过 2.0%。

4.2.2 注射液（包括重组人胰岛素注射液、精蛋白重组人胰岛素注射液及精蛋白重组人胰岛素混合注射液）：按峰面积归一化法计算，A₂₁ 脱氨人胰岛素不得过 2.0%，其他杂质峰面积之和不得过 6.0%。

5 注意事项

调节流动相 A 与流动相 B 为适宜的比例，使重组人胰岛素峰与 A₂₁ 脱氨人胰岛素峰及其他杂质峰达到有效分离。

起草人：丁晓丽 张伟

复核人：梁成罡 张慧

高分子蛋白质检查法

1 原理

重组人胰岛素原料及制剂，在生产及贮存过程中，易产生重组人胰岛素二聚体及多聚体，影响产品的安全性及有效性。采用分子排阻色谱法，使重组人单体及二聚体、多聚体达到有效分离，并采用面积归一化法对其高分子蛋白质进行定量。

2 材料和设备

2.1 仪器设备 高效液相色谱仪。

2.2 材料和试剂

2.2.1 试剂及溶液 冰醋酸（分析纯）、精氨酸（分析纯）、盐酸（分析纯）、乙腈（色谱纯）、重组人胰岛素单体-二聚体对照品。

0.1%精氨酸溶液：称取精氨酸 1g，加水 1000ml，混匀，即得。

0.01mol/L 盐酸溶液：取盐酸 83μl，加水稀释至 100ml，混匀，即得。

9.6mol/L 盐酸溶液：取盐酸 8ml，加水稀释至 10ml，混匀，即得。

流动相：冰醋酸-乙腈-0.1%精氨酸溶液（15:20:65）。

2.2.2 材料 亲水改性硅胶为填充剂（5~10μm），如：Waters Insulin HMWP 7.8mm×300mm 或其他适宜的色谱柱。

3 操作方法

3.1 样品制备

3.1.1 系统适用性溶液：取重组人胰岛素单体-二聚体对照品，用 0.01mol/L 盐酸溶液溶解并稀释制成每 1ml 中含 4mg 的溶液，作为系统适用性溶液。

3.1.2 原料：精密称取供试品 20mg，加入 0.01mol/L 盐酸溶液溶解并定容至 5ml，混匀，

作为供试品溶液。

3.1.3 注射液（包括重组人胰岛素注射液、精蛋白重组人胰岛素注射液及精蛋白重组人胰岛素混合注射液）：取本品，每 1ml 中加 9.6mol/L 盐酸溶液 3 μ l，作为供试品溶液。

3.2 样品检测 色谱条件：柱温为室温；进样器温度为 2~8 $^{\circ}$ C；流速为 0.5ml/min；检测器为紫外检测器；检测波长为 276nm；进样体积为 100 μ l，注入色谱仪，记录色谱图。

4 结果判定

4.1 系统适用性要求：重组人胰岛素单体峰与二聚体峰的分离度应符合要求。

4.2 合格标准

4.2.1 重组人胰岛素：按峰面积归一化法计算，保留时间小于重组人胰岛素主峰的所有峰面积之和不得大于 1.0%。

4.2.2 重组人胰岛素注射液：按峰面积归一化法计算，保留时间小于重组人胰岛素峰的所有峰面积之和不得大于 2.0%。

4.2.3 精蛋白重组人胰岛素注射液及精蛋白重组人胰岛素混合注射液：按峰面积归一化法计算，保留时间小于重组人胰岛素主峰的所有峰面积之和不得大于 3.0%。

起草人：吕萍 孙悦

复核人：梁成罡 张慧

锌含量测定法

1 原理

重组人胰岛素及制剂锌含量采用原子吸收分光光度法（火焰法）进行测定。锌浓度与吸光度在一定范围内呈线性关系，根据标准曲线计算被测物中锌含量。

2 材料和设备

2.1 仪器设备 配有锌空心阴极灯和具有适宜组成的空气/乙炔焰的原子吸收光谱仪。

2.2 材料和试剂

2.2.1 试剂及溶液 单元素锌对照品（原子吸收级或类似级别）、盐酸（分析纯）。Milli-Q 水（或相当级别的纯化水）。0.01mol/L 盐酸溶液：取盐酸 83 μ l，加水稀释至 100ml，混匀，即得。

2.2 材料 A 类玻璃器具、移液管及量瓶。

3 操作方法

3.1 样品制备

3.1.1 对照品溶液：精密量取锌单元素标准溶液（100 μ g/ml）适量，用 0.01mol/L 的盐酸溶液分别定量稀释成每 1ml 含锌 0.2 μ g，0.4 μ g，0.6 μ g，0.8 μ g，1.0 μ g 的溶液作为锌标准曲线溶液。

3.1.2 空白溶液：0.01mol/L 的盐酸溶液。

3.1.3 原料：精密称取供试品适量，用 0.01mol/L 盐酸溶液制成每 1ml 约含锌 0.4~0.8 μ g

的溶液作为供试品溶液。

3.1.4 注射液（重组人胰岛素注射液）：精密量取供试品适量，用 0.01mol/L 盐酸溶液制成每 1ml 约含锌 0.4~0.8 μg 的溶液作为供试品溶液。

3.1.5 注射液（精蛋白重组人胰岛素注射液及精蛋白重组人胰岛素混合注射液）：取供试品适量，每 1ml 中加 9.6mol/L 盐酸溶液 3 μl ，使溶液澄清，然后精密量取适量，用 0.01mol/L 盐酸溶液制成每 1ml 约含锌 0.4~0.8 μg 的溶液作为供试品溶液。

3.2 检测 在波长 213.9nm 条件下对空白溶液、标准曲线溶液和供试品溶液进行测定，记录吸光度值。

4 试验要求及结果计算

4.1 以锌标准曲线溶液浓度为横坐标，以吸光度为纵坐标绘制标准曲线，标准曲线的相关系数不低于 0.997。

4.2 根据标准曲线计算供试品溶液锌含量。

5 结果判定

重组人胰岛素：按干燥品计算，含锌量不得过 1.0%。

重组人胰岛素注射液：每 100 单位锌含量应为 10~40 μg 。

精蛋白重组人胰岛素注射液：每 100 单位锌含量应为 10~40 μg 。

精蛋白重组人胰岛素混合注射液：每 100 单位锌含量应为 10~40 μg 。

6 注意事项

6.1 所使用的玻璃器具及移液管均应无锌污染，建议用 2%硝酸溶液冲洗 2 次，随后用 Milli-Q 水（或相当级别的纯化水）冲洗 2 次。

6.2 元素灯打开至少 30 分钟后开始实验，保证吸光度值稳定。

6.3 锌标准曲线最高浓度溶液吸光度值应低于 0.8，以保证标准曲线相关系数符合要求。

起草人：张伟 张慧

复核人：梁成罡 李晶

抑菌剂含量测定法

1 原理

重组人胰岛素制剂中通常加入适量的苯酚或间甲酚作抑菌剂，有的加入单一抑菌剂，有的加入混合抑菌剂，测定时参照重组人胰岛素制剂各论项下的方法配制对照品溶液及供试品溶液。苯酚或间甲酚的含量采用 RP-HPLC 方法进行测定，紫外检测器的响应值与被测物质的量在一定范围内呈线性关系，因此采用外标法以峰面积计算含量。

2 材料和设备

2.1 仪器设备：高效液相色谱仪。

2.2 材料和试剂

2.2.1 试剂及溶液：无水硫酸钠（分析纯）、乙醇胺（分析纯）、盐酸（分析纯）、磷酸（分析纯）、乙腈（色谱纯）、苯酚对照品、间甲酚对照品。

0.2mol/L 硫酸盐缓冲液：取无水硫酸钠 28.4g，加水溶解后，加磷酸 2.7ml、水 800ml，用乙醇胺调节 pH 值至 2.3，加水至 1000ml，混匀，即得。

0.01mol/L 盐酸溶液：取盐酸 83 μ l，加水稀释至 100ml，混匀，即得。

9.6mol/L 盐酸溶液：取盐酸 8ml，加水稀释至 10ml，混匀，即得。

流动相：0.2mol/L 硫酸盐缓冲液（pH 2.3）-乙腈（74:26）或适宜比例

2.2.2 材料：十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂，如：Vydac C18 柱，250mm \times 4.6mm，粒度 5 μ m 或其他适宜的色谱柱。

3 操作方法

3.1 样品制备

3.1.1 系统适用性溶液：称取重组人胰岛素对照品 10mg，加入 0.01mol/L 盐酸溶液溶解并稀释定容至 10ml，配制浓度为 1mg/ml 的重组人胰岛素溶液，将该溶液加入至对照品溶液中，混合均匀，作为系统适用性溶液。

3.1.2 对照品溶液：参照重组人胰岛素制剂各论项下的方法配制适宜浓度的苯酚对照品溶液、间甲酚对照品溶液或苯酚与间甲酚混合对照品溶液。

3.1.3 注射液（包括重组人胰岛素注射液、精蛋白重组人胰岛素注射液及精蛋白重组人胰岛素混合注射液）：取本品，每 1ml 中加 9.6mol/L 盐酸溶液 3 μ l，然后参照重组人胰岛素制剂各论项下的方法，精密量取适量，加入 0.01mol/L 盐酸溶液稀释至适宜浓度，作为供试品溶液。

3.2 检测 色谱条件：柱温为 40 $^{\circ}$ C；进样器温度为 2~8 $^{\circ}$ C；流速为 1ml/min；检测器为紫外检测器；检测波长为 270nm；进样体积为 20 μ l，注入色谱仪，记录色谱图。

4 结果判定

4.1 系统适用性要求 重组人胰岛素峰与苯酚峰、间甲酚峰之间的分离度应符合要求。

4.2 合格标准

4.2.1 重组人胰岛素注射液及精蛋白重组人胰岛素注射液：每 1ml 中含苯酚或间甲酚应为标示量的 80.0%~110.0%。

4.2.2 精蛋白重组人胰岛素混合注射液：每 1ml 中含苯酚或间甲酚应为标示量的 90.0%~110.0%。

起草人：丁晓丽 陈莹

复核人：梁成罡 张慧

上清液中的重组人胰岛素检查法

1 原理

通过高效液相色谱法测定精蛋白锌重组人胰岛素注射液的上清液中重组人胰岛素。离心使精蛋白锌重组人胰岛素沉淀，未与鱼精蛋白结合的残留重组人胰岛素存在于上清液中，通过高效液相色谱法对上清液中的重组人胰岛素进行定量测定。

2 材料和试剂

2.1 溶液和试剂

2.1.1 试剂

2.1.1.1 重组人胰岛素对照品 [中国食品药品检定研究院, 以 $C_{257}H_{383}N_{65}O_{77}S_6$ (包括 A_{21} 脱氨人胰岛素) 计, 效价为 26.3IU/mg, 或企业提供]。

2.1.1.2 无水硫酸钠 (分析纯)、磷酸 (分析纯)、乙醇胺 (分析纯)、盐酸 (分析纯)、乙腈 (色谱纯)。

2.1.2 溶液

2.1.2.1 0.01mol/L 盐酸溶液: 取盐酸 900 μ l, 加水稀释至 1000ml, 混匀, 即得。

2.1.2.2 9.6mol/L 盐酸溶液: 取盐酸 8ml, 加水稀释至 10ml, 混匀, 即得。

2.1.2.3 0.2mol/L 硫酸盐缓冲液: 取无水硫酸钠 28.4g, 加水溶解后, 加磷酸 2.7ml、水 800ml, 用乙醇胺调节 pH 值至 2.3, 加水至 1000ml, 混匀, 即得。

2.1.2.4 流动相: 取 0.2mol/L 硫酸盐缓冲液 740ml, 加入乙腈 260ml (或适宜比例), 混匀, 0.45 μ m 滤膜过滤, 脱气, 即得。

2.1.2.5 系统适用性溶液: 取重组人胰岛素对照品适量, 用 0.01mol/L 盐酸溶解并稀释至浓度为 1mg/ml, 室温放置至少 24 小时, 作为系统适用性溶液。

2.1.2.6 空白溶液: 0.01mol/L 盐酸溶液作为空白溶液。

2.2 材料 十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂 (5~10 μ m) 色谱柱。

3 操作方法

3.1 色谱条件

流动相: 0.2mol/L 硫酸盐缓冲液-乙腈 (74:26)。

流速: 1.0ml/min。

检测器: 紫外检测器。

检测波长: 214nm。

柱温: 40 $^{\circ}$ C。

进样器温度: 2~8 $^{\circ}$ C。

进样体积: 100 μ l。

3.2 样品制备

3.2.1 对照品溶液: 取重组人胰岛素对照品适量, 精密称定, 用 0.01mol/L 盐酸溶液定量稀释制成每 1ml 中约含 50 μ g (约 1 单位) 的溶液作为对照品溶液 (临用新配)。

3.2.2 供试品溶液: 取本品 10ml, 1500g 离心 10 分钟, 取上清液, 每 1ml 加 9.6mol/L 盐酸溶液 3 μ l, 混匀, 作为供试品溶液。

4 计算

$$C_w = \frac{A_w \times C_s}{A_s}$$

式中, A_w 为供试品峰面积; A_s 为对照品峰面积; C_w 为上清液中含人胰岛素的量, 单位: IU/ml; C_s 为对照品浓度, 单位: IU/ml。

5 结果与判定

5.1 系统适用性标准 重组人胰岛素峰与 A₂₁ 脱氨人胰岛素峰（与重组人胰岛素峰的相对保留时间约为 1.3）的分离度不小于 1.8，拖尾因子不大于 1.8。

5.2 标准规定 上清液中含重组人胰岛素的量不得过 1IU/ml。

6 注意事项

离心后若上清中仍有白色絮状物，应再次离心至上清澄清。

起草人：丁晓丽 孙悦 陈莹

复核人：梁成罡 张慧

可溶性重组人胰岛素含量测定法

1 原理

通过高效液相色谱法测定精蛋白锌重组人胰岛素注射液中可溶性重组人胰岛素。调节供试品溶液的 pH 值，把吸附在胰岛素和鱼精蛋白共结晶的晶体表面上的可溶性胰岛素部分分解离出来，存在于上清液中，通过高效液相色谱法对上清液中的可溶性重组人胰岛素进行测定。

2 材料和试剂

2.1 溶液和试剂

2.1.1 试剂 三（羟甲基）氨基甲烷（Tris）（分析纯）、氢氧化钠（分析纯）、无水硫酸钠（分析纯）、磷酸（分析纯）、乙醇胺（分析纯）、盐酸（分析纯）、乙腈（色谱纯）

2.1.2 溶液

2.1.2.1 0.05mol/L 盐酸溶液：取盐酸 417 μ l，加水稀释至 100ml，混匀，即得。（方法二使用）

2.1.2.2 9.6mol/L 盐酸溶液：取盐酸 8ml，加水稀释至 10ml，混匀，即得。

2.1.2.3 0.1mol/L Tris-盐酸缓冲液：称取 Tris 1.2114g，加水 80ml 溶解，用盐酸溶液调 pH 至 8.2，加水定容至 100ml。注：缓冲液在 25℃ 下配制，临用现配。（方法一使用）

2.1.2.4 0.05mol/L 氢氧化钠溶液：称取氢氧化钠 0.2g，加水稀释至 100ml，混匀，即得。（方法二使用）

2.1.2.5 1mol/L 氢氧化钠溶液：称取氢氧化钠 0.4g，加水稀释至 10ml，混匀，即得。（方法二使用）

2.1.2.6 0.2mol/L 硫酸盐缓冲液：取无水硫酸钠 28.4g，加水溶解后，加磷酸 2.7ml、水 800ml，用乙醇胺调节 pH 值至 2.3，加水至 1000ml，混匀，即得。

2.1.2.7 流动相：取 0.2mol/L 硫酸盐缓冲液 740ml，加入乙腈 260ml（或适宜比例），混匀，0.45 μ m 滤膜过滤，脱气，即得。

2.1.2.8 系统适用性溶液：取重组人胰岛素对照品，用 0.01mol/L 盐酸溶解并稀释至浓度为 1mg/ml，室温放置至少 24 小时，作为系统适用性溶液。

2.1.2.9 空白溶液：0.01mol/L 盐酸溶液作为空白溶液。

2.2 材料 十八烷基烷键合硅胶为填充剂（5~10 μm ）色谱柱、0.45 μm 滤膜、0.2 μm 滤膜。（方法一使用）

3 操作方法

3.1 色谱条件

流动相：0.2mol/L 硫酸盐缓冲液-乙腈（74:26）。

流速：1.0ml/min。

检测器：紫外检测器。

检测波长：214nm。

柱温：40 $^{\circ}\text{C}$ 。

进样器温度：2~8 $^{\circ}\text{C}$ 。

进样体积：20 μl 。

3.2 供试品溶液制备

3.2.1 方法一

3.2.1.1 可溶性人胰岛素供试品溶液：取本品，约 15ml，混匀，轻柔搅拌下精密量取 5ml 与 0.1mol/L Tris-盐酸缓冲液等体积混匀。与 0.1mol/L Tris-盐酸缓冲液（pH 8.2，25 $^{\circ}\text{C}$ ）等体积混合，振摇，室温（25 $^{\circ}\text{C}$ ）放置 1 小时，用 0.2 μm 滤膜滤过，取滤液，每 1ml 用 9.6mol/L 盐酸溶液 3 μl 酸化后作为可溶性人胰岛素供试品溶液。

3.2.1.2 总人胰岛素供试品溶液：取本品，每 1ml 加 9.6mol/L 盐酸溶液 3 μl ，待溶液澄清后，用 0.01mol/L 盐酸溶液稀释到浓度与可溶性人胰岛素供试品溶液相当的人胰岛素量作为总人胰岛素供试品溶液。

3.2.2 方法二

3.2.2.1 可溶性人胰岛素供试品溶液：取本品 5ml，每 1ml 加 1mol/L 氢氧化钠溶液 4 μl ，用 0.05mol/L 氢氧化钠溶液或盐酸溶液调 pH 至 8.35 \pm 0.02，记录加入的氢氧化钠或盐酸的量（计入总稀释体积，单位用 μl ），放置 1 小时，3000 转/分钟离心 10 分钟，取上清液，再次 3000 转/分钟离心 10 分钟。取上清液，每 1ml 加 9.6mol/L 的盐酸溶液 3 μl ，混匀，作为可溶性人胰岛素供试品溶液，整个实验过程保持温度在 25 $^{\circ}\text{C}$ \pm 1 $^{\circ}\text{C}$ 。

3.2.2.2 总人胰岛素供试品溶液：取本品，每 1ml 加 9.6mol/L 盐酸溶液 3 μl 混匀，待溶液澄清后，用 0.01mol/L 盐酸溶液稀释到浓度与可溶性人胰岛素供试品溶液相当的人胰岛素量作为总人胰岛素供试品溶液。

4 计算

4.1 方法一

$$W(\%) = \frac{A_w \times 2}{A_s} \times 100\%$$

式中，W 为可溶性人胰岛素含量，%； A_w 为可溶性人胰岛素供试品峰面积（重组人胰岛素峰与 A_{21} 脱氨人胰岛素峰面积之和）； A_s 为总人胰岛素供试品峰面积（重组人胰岛素峰与 A_{21} 脱氨人胰岛素峰面积之和）。

4.2 方法二

$$W(\%) = \frac{A_w \times (S + V_1 + V_2)}{A_s \times 5} \times 100\%$$

式中, W 为可溶性门冬胰岛素含量, %; V_1 为 1mol/L 氢氧化钠溶液加入量, ml; V_2 为调 pH 用 0.05mol/L 氢氧化钠溶液或盐酸溶液加入量, ml; A_w : 可溶性人胰岛素供试品峰面积(重组人胰岛素峰与 A_{21} 脱氨人胰岛素峰面积之和); A_s 为总人胰岛素供试品峰面积(重组人胰岛素峰与 A_{21} 脱氨人胰岛素峰面积之和)。

5 结果与判定

5.1 系统适用性标准: 重组人胰岛素峰与 A_{21} 脱氨人胰岛素峰(与重组人胰岛素峰的相对保留时间约为 1.3) 的分离度不小于 1.8, 拖尾因子不大于 1.8。

5.2 标准规定: 可溶性人胰岛素含量应为人胰岛素总量的 25.0%~35.0%。

6 注意事项

样品中精蛋白锌重组人胰岛素容易沉淀, 需要在轻柔搅拌过程中量取样品, 防止样品沉淀和产生气泡。

起草人: 张慧 丁晓丽

复核人: 梁成昱 李晶

胰岛素生物活性测定法

1 原理

胰岛素具有降低血糖的药理作用, 其生物测定方法系比较胰岛素标准品(S)与供试品(T)引起小鼠血糖下降的作用, 以测定供试品的效价。

2 材料和设备

2.1 仪器设备 天平(分度值: 0.01mg 或 0.1mg, 标准品或供试品称量用; 分度值: 0.01mg 或 1mg, 试剂称量用; 分度值: 0.1g, 小鼠称重用)。pH 计; 血糖仪及其血糖试纸。移液枪及其吸头、注射器(1ml 以下, 精度 0.01ml)、量瓶、吸管、移液管、烧杯、量筒、毛细管、剪刀。

2.2 实验动物 健康合格、体重 20~26g、同一来源、品系、性别和饲养条件, 出生日期相近(3 日内)的成年小鼠 40 只, 体重相差不超过 3g, 实验前按体重均匀分盒放置。

2.3 溶液和试剂 0.9%氯化钠溶液(pH 2.5)(含苯酚): 称取氯化钠 4.5g, 加水近 500ml, 加苯酚 1g, 用 3mol/L 盐酸调节 pH 至 2.5 后, 补足水至 500ml。

3 操作方法

3.1 样品制备

3.1.1 标准品溶液: 取胰岛素标准品, 放置至室温。割开标准品小管(注意勿使玻璃屑掉入),

精密称量置小烧杯中。将称得的毫克数，乘以标示单位数，得总单位数。精密加入 0.9%氯化钠 (pH 2.5) (含苯酚) 配成 20U/ml 的溶液。置 4~8℃ 保存备用，以不超过 5 天为宜。

3.1.2 标准品稀释液：实验当日取标准品溶液放置至室温，精密量取 1.0ml 加 0.9%氯化钠溶液 (pH 2.5) 19.0ml，使成 1.0U/ml 溶液。根据动物品系、来源、季节按《中国药典》2015 年版四部通则 1211 胰岛素生物检定法的要求，取 1.0U/ml 溶液适量按高低剂量组 (d_{S2} 、 d_{S1}) 加 0.9%氯化钠溶液 (pH 2.5) 配成两种浓度的稀释液，高低剂量比值 (r) 不大于 1:0.5。高浓度稀释液一般可制成 0.06~0.12U/ml。

3.1.3 供试品溶液与稀释液：按胰岛素供试品的标示效价或估计效价配制溶液，其比值 (r) 应与标准品相等，供试品与标准品高低剂量所致的反应平均值应相近。粉末 (原料及纯度不高的样品及研制和改进阶段的产品)：按标准品溶液及稀释液配制方法操作，配制高 (d_{T2})、低 (d_{T1}) 两种浓度的稀释液。注射液：精密量取适量放置至室温的供试品溶液，加 0.9%氯化钠 (pH 2.5)，配成 1.0U/ml 溶液，然后同标准品稀释液配置方法，配制高 (d_{T2})、低 (d_{T1}) 两种浓度的稀释液。

3.2 测定方法

3.2.1 准备 4 个实验用鼠盒，分别标明组别。实验当日将小鼠按体重随机分配于各剂量组盒中，每组 10 只，逐只编号，供饲料及饮水。

3.2.2 第一次实验：给药：按 d_{S1} 、 d_{S2} 、 d_{T1} 、 d_{T2} 组顺序，各组小鼠分别自颈部皮下注射一种浓度的标准品或供试品溶液 0.2~0.3ml/只，各鼠注射体积 (ml) 应相等。立即记时，每只动物给药间隔一定时间 (视操作者熟练程度)，自给药开始换盒、禁食、供水。测定血糖值：给药后每只准确 40 分钟，按给药顺序依次用毛细管刺破小鼠眼内眦静脉丛 (或剪断小鼠尾尖) 出一滴血，立即用血糖仪血糖试纸测定其血糖值。

3.2.3 交叉实验 (第二次实验)：在第一次给药后间隔至少 3 小时进行。按双交叉设计，对每组的各鼠进行第二次给药，给药顺序见如下给药顺序。

	第一组	第二组	第三组	第四组
第一次	d_{S1}	d_{S2}	d_{T1}	d_{T2}
第二次	d_{T2}	d_{T1}	d_{S2}	d_{S1}

除给药顺序外，以下操作同第一次实验。

3.3 数据分析 将每鼠反应值 (即血糖值 mmol/L, y) 按《中国药典》2015 年版四部通则 1431 生物检定统计法列表格式整理。按量反应平行线测定 (2.2) 法，双交叉设计处理结果。可应用软件程序计算效价及实验误差。本法的可信限率 (FL%) 不得大于 25%。实验结果中出现的特大、特小等特异反应值，按《中国药典》规定判断其是否可以剔除。个别剂量组缺失的数据，如符合该通则的要求，按所规定的方法补足。

4 结果判定

4.1 实验成立 胰岛素双交叉法的可靠性测验应为回归变异项非常显著，偏离平行不显著，否则实验结果不成立。对实验结果不成立者，应做以下检查。

检查实验操作包括溶液配制、操作技术、实验动物的饲养等是否符合本实验的要求；试品间如非常显著说明测得效价与估计效价相差较大，应调整剂量或估计效价重复实验；次间×试

品间、次间×回归、次间×偏离平行如非常显著说明该项变异在第一次与第二次实验间有差别，对出现这种情况的检定结果，下结论时应慎重，最好复试。

4.2 实验误差(FL%)的判断：按药典规定本法可信限率FL(%)不得大于25%，超过者，可做以下处理：检查动物来源、实验操作、对动物的照顾等是否符合本实验的要求；重复实验；按规定将几次实验结果合并计算，求得合并计算的效价和实验误差，应符合规定。

5 注意事项

5.1 动物 动物质量与实验成功率及误差关系密切。实验所用动物应健康合格、来源、品系、性别、饲养条件应相同，出生日期相近，体重相差不得超过3g。饥饿时间能影响小鼠对胰岛素的敏感度，在试验前可禁食3~4小时，减小组内差异，提高试验成功率。

5.2 剂量 小鼠正常血糖值为6.7~8.9mmol/L。高浓度稀释液一般可制成0.06~0.12U/ml，调节剂量使低剂量能引起血糖明显下降(指血糖能降低20%~30%)，高剂量不致引起血糖过度降低(指不致使血糖值低于2.8mmol/L)，高低剂量间引起的血糖下降有明显差别。

5.3 给药 皮下注射勿使药液溢出，每次注射时调换部位。如第一次给药自一侧颈部皮下进针，第二次在另一侧进针，将药液注入不同部位。每只动物给药结束计时。

5.4 测定血糖值 适宜的方法测定血糖值，也可采用葡萄糖氧化酶-过氧化酶法测定，参照《中国药品检验标准操作规范》。

5.5 胰岛素降糖作用与温度关系密切，实验室应恒温恒湿，可根据季节温度的变化适当调节剂量。

5.6 本规范适用于《中国药典》2015年版四部通则1211胰岛素生物测定法，即定量方法，多用于标准品标定、胰岛素类似物生物测定等。各论中简化的生物测定法即半定量法，适用于胰岛素原料的生物测定。实验时动物数减半，实验采用随机设计，照生物检定统计法(通则1431)中量反应平行线测定随机设计法计算效价，不考虑实验误差(FL%)。

起草人：李湛军 梁誉龄 徐可铮

复核人：梁成罡 吕萍

重组人胰岛素含量测定法

1 原理

重组人胰岛素含量采用国际通用的RP-HPLC方法进行测定。紫外检测器的响应值与被测物质的量在一定范围内呈线性关系，因此采用外标法以峰面积计算含量。因A₂₁脱氨人胰岛素也具有生物活性，含量以重组人胰岛素及A₂₁脱氨人胰岛素的峰面积之和进行计算。

2 材料和设备

2.1 仪器设备 温浴系统、高效液相色谱仪。

2.2 材料和试剂

2.2.1 试剂 无水硫酸钠(分析纯)、乙醇胺(分析纯)、盐酸(分析纯)、磷酸(分析纯)、乙腈(色谱纯)、重组人胰岛素对照品。

2.2.2 溶液

2.2.2.1 0.2mol/L 硫酸盐缓冲液:取无水硫酸钠 28.4g,加水溶解后,加磷酸 2.7ml、水 800ml,用乙醇胺调节 pH 值至 2.3,加水至 1000ml,混匀,即得。

2.2.2.2 0.01mol/L 盐酸溶液:取盐酸 83 μ l,加水稀释至 100ml,混匀,即得。

2.2.2.3 9.6mol/L 盐酸溶液:取盐酸 8ml,加水稀释至 10ml,混匀,即得。

流动相:0.2mol/L 硫酸盐缓冲液(pH 2.3)-乙腈(74:26)或适宜比例。

2.3 材料 十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂,如:Vydac C18 柱,250mm \times 4.6mm,粒度 5 μ m 或其他适宜的色谱柱。

3 操作方法

3.1 样品制备

3.1.1 系统适用性溶液:称取重组人胰岛素对照品 10mg,加入 0.01mol/L 盐酸溶液溶解并稀释定容至 10ml,室温放置至少 24 小时,作为系统适用性溶液。

3.1.2 对照品溶液:精密称取重组人胰岛素对照品 10mg,加入 0.01mol/L 盐酸溶液溶解并定容至 25ml,混匀,作为对照品溶液。

3.1.3 原料:精密称取供试品 10mg,加入 0.01mol/L 盐酸溶液溶解并定容至 25ml,混匀,作为供试品溶液。

3.1.4 注射液(包括重组人胰岛素注射液、精蛋白重组人胰岛素注射液及精蛋白重组人胰岛素混合注射液):取本品,每 1ml 中加 9.6mol/L 盐酸溶液 3 μ l,然后精密量取 1ml(规格为 100IU/ml),加入 0.01mol/L 盐酸溶液稀释定容至 10ml,或精密量取 2.5ml(规格为 40IU/ml),加入 0.01mol/L 盐酸溶液稀释定容至 10ml,作为供试品溶液。

3.2 检测 色谱条件:柱温为 40 $^{\circ}$ C;进样器温度为 2~8 $^{\circ}$ C;流速为 1ml/min;检测器为紫外检测器;检测波长为 214nm;进样体积为 20 μ l,注入色谱仪,记录色谱图。

4 结果判定

4.1 系统适应性要求:重组人胰岛素峰与 A₂₁脱氨人胰岛素峰(与重组人胰岛素峰的相对保留时间约为 1.3)的分离度不小于 1.8,拖尾因子不大于 1.8。

4.2 合格标准

4.2.1 重组人胰岛素:按干燥品计算,含重组人胰岛素(包括 A₂₁脱氨人胰岛素)应为 95.0%~105.0%。

4.2.2 重组人胰岛素注射液及精蛋白重组人胰岛素注射液:含重组人胰岛素应为标示量的 90.0%~110.0%。

4.2.3 精蛋白重组人胰岛素混合注射液:含重组人胰岛素应为标示量的 95.0%~105.0%。

5 注意事项

对照品溶液及供试品溶液应临用新配。

起草人:丁晓丽 张伟

复核人:梁成罡 张慧

重组人生长激素

简 述

重组人生长激素（Recombinant Human Growth Hormone）由 191 个氨基酸残基组成的蛋白质，分子式为 $C_{990}H_{1528}N_{262}O_{300}S_7$ ，分子量为 22125kDa，等电点为 5.2。该蛋白质为单链非糖基化蛋白激素，链内有 2 个二硫键。重组人生长激素与人体内源 GH 有相同的药理作用，能刺激软骨细胞和成骨细胞的分化、增殖，引起线形生长加速及骨骼变宽；促进全身蛋白质合成、刺激免疫球蛋白的合成，刺激淋巴样组织、巨嗜细胞和淋巴细胞的增殖；刺激烧伤创面及手术切口胶原细胞合成纤维细胞，巨嗜细胞分裂增殖，加速伤口愈合；促进心肌蛋白合成、调节脂肪代谢；补充生长激素不足或缺乏，调节成人的脂肪代谢、骨代谢和心肾功能。

hGH 主要用于因内源性 GH 缺乏引起的儿童侏儒症。由慢性肾衰引起的生长停滞、特纳综合征、骺骨闭合的成人生长激素缺乏、胎儿生长不良、增加严重烧伤病人的氮保留、单方或与谷氨酰胺组方治疗短肠综合征、辅助治疗由于促性腺激素分泌不足或双侧输卵管阻塞或已用体内或体外授精的不明原因的不孕病人，诱导其排卵、治疗 Prader-Willi 综合征。另外由于人从 21 岁到 60 岁，体内生长激素水平平均下降 80%，因此对 hGH 分泌不足的人群，适当补充 hGH，还可能延缓衰老。

重组人生长激素的检定内容按照生产阶段分为原液、半成品、制剂。其中原料检定主要包括性状、HPLC 鉴别、肽图鉴别、等电聚焦、N 末端氨基酸序列分析、相关蛋白质、高分子蛋白质、细菌内毒素、宿主蛋白残留、宿主 DNA 残留、残余抗生素活性、体内动物活性、HPLC 含量测定等；半成品检定主要包括无菌检查、细菌内毒素检查等；目前《中国药典》收录的注射用重组人生长激素检定一般分为性状、液相鉴别、等电聚焦鉴别、酸碱度、溶液澄清度与颜色、相关蛋白质、高分子蛋白质、水分、可见异物、装量差异、不溶性微粒、异常毒性、无菌、细菌内毒素、HPLC 含量测定等。重组人生长激素原液及制剂检定涉及到的特异性检测方法包括等电聚焦、肽图鉴别、相关蛋白质、重组人生长激素生物活性、含量测定，具体描述如下。

等电聚焦鉴别法

1 原理

等电聚焦电泳法（IEF）是两性电解质在电泳场中形成一个 pH 梯度，由于蛋白质为两性化合物，其所带的电荷与介质的 pH 值有关，带电的蛋白质在电泳中向极性相反的方向迁移，当到达其等电点（此处的 pH 值使相应的蛋白质不再带电荷）时，电流达到最小，不再移动，从而达到检测蛋白质类和肽类供试品等电点的电泳方法。该方法用于生物制品中蛋白质的定性鉴定、等电点测定、限度检查以及定量测定。聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳法是最常见的 IEF 电泳方法。通过生长激素供试品溶液主带位置与对照品溶液主带位置是否一致，来对生

长激素进行鉴别。

2 材料和设备

2.1 仪器设备 恒压或恒流电源、带有冷却装置的水平板电泳槽和制胶模具。

2.2 材料和试剂

2.2.1 水 (电导率应不大于 $18.2\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$)。

2.2.2 A 液: 称取丙烯酰胺 5.0g, 亚甲基双丙烯酰胺 0.15g, 加适量水溶解, 并稀释至 50ml, 双层滤纸滤过, 避光保存。

2.2.3 B 液: 10%过硫酸铵溶液, 临用新配。

2.2.4 甲基红试液: 称取甲基红 5mg, 加 0.05mol/L 氢氧化钠 10ml 溶解, 混匀。

2.2.5 50%甘油。

2.2.6 正极液 0.5mol/L 磷酸溶液。

2.2.7 负极液 1mol/L 氢氧化钠溶液。

2.2.8 固定液: 20%三氯醋酸。

2.2.9 染色贮备液: 称取考马斯亮蓝 G250 1.0g, 加水 20ml 溶解, 作为溶液 1; 称取硫酸铵 125g, 加水 400ml 溶解, 作为溶液 2; 称取磷酸 20g, 作为溶液 3; 将溶液 3 加入到溶液 1 中, 待考马斯亮蓝 G250 完全溶解后, 与溶液 2 混合, 并加水至 1L, 混匀, 即得, 用前应充分摇匀。

2.2.10 工作染色液: 取 60ml 染色贮备液, 与 30ml 甲醇混匀, 临用新配。

2.2.11 脱色液: 蒸馏水。

3 操作方法

3.1 制胶 取 A 液 2.5ml, pH 3~10 的两性电解质(或其他 pH 范围的两性电解质)0.35ml, 水 1.25ml, 50%甘油 0.5ml, 混匀, 抽气 5~10 分钟, 加 B 液 25 μl , *N, N, N', N'*-四甲基乙二胺 6 μl , 混匀后缓慢地注入水平模具内, 室温下聚合。

3.2 样品制备 取重组人生长激素原液用水稀释成每 1ml 含重组人生长激素 1mg 的溶液, 取此溶液 90 μl , 加两性电解质 10 μl 和甲基红试液 2 μl , 混匀得供试品溶液; 另取重组人生长激素对照品, 同法制备, 作为对照品溶液。

3.3 预电泳 将已聚合的聚丙烯酰胺凝胶放到冷却板上, 其间涂以液体石蜡或煤油并避免气泡的产生。用正极液与负极液分别润湿正极与负极电极条, 然后分别放于阳极与阴极上, 将电极对准电极条中心, 加盖, 在恒压法下进行测定, 在起始电压 200V 下预电泳 30 分钟。

3.4 电泳 将加样滤纸条以一定间隔置于凝胶上, 加入供试品、对照品及等电点标准溶液 10 μl 。选择恒压方式进行电泳, 起始电压为 200V。电泳 0.5~1 小时待甲基红迁出加样条后, 去除加样条。调高电压至 400V, 电泳至电流不再变化, 再调高电压至 600V, 待电流不再变化时停止电泳。

3.5 固定与染色 电泳完毕后, 取出胶片, 置于固定液中固定 20 分钟以上, 取出胶片, 置染色液中 3 小时, 用脱色液脱色至背景透明后取出。

4 结果判定

4.1 系统适用性要求: 等电点标准品条带应符合说明书提供谱带图示, 在泳道中从上至下

的分布范围与其标准蛋白等电点相一致。以各标准品的等电点 (pI) 对其相应的迁移距离作线性回归, 所得标准线性方程 $R^2 \geq 0.95$ 。

4.2 供试品合格标准: 供试品溶液的主带位置与对照品主带位置一致, 且等电点 pI 应为 4.0~6.5。

起草人: 王绿音 李皓

复核人: 梁成罡 李晶

肽图鉴别法

1 原理

肽图谱对每一种蛋白质来说是特征的、专一的。通过肽图分析可以鉴别蛋白质, 预测其一级结构, 比较功能相近的蛋白质结构的类似性和各批产品的蛋白质结构的一致性。经 TPCK 处理的胰蛋白酶可特异性切割肽段中赖氨酸及精氨酸 C 末端的肽键, 得到相应的存在极性差异的肽段, 通过反相 HPLC 进行分离检测, 通过比较供试品与对照品的肽图谱, 即可鉴别一级结构上是否具有同质性。

2 材料和设备

2.1 仪器设备 高效液相色谱仪、超声波清洗仪、水浴锅、 -20°C 冰箱。

2.2 试剂 重组人生长激素对照品、经 TPCK 处理的胰酶、三羟甲基氨基甲烷、三氟乙酸、乙腈

2.3 溶液

2.3.1 1mol/L 盐酸: 量取 8.3ml 盐酸 (36%~38%), 加入 90ml 水中, 稀释至 100ml, 混匀。

2.3.2 0.05mol/L Tris 缓冲液: 称取 12.114g 三羟甲基氨基甲烷, 加入 1800ml 水, 搅拌混匀, 用 1mol/L 盐酸调节 pH 值至 7.5, 加水至 2000ml。

2.3.3 胰酶溶液: 称取 10mg 胰酶, 加入 0.05mol/L Tris 缓冲液定容至 5ml, 制得浓度为 2mg/ml 的胰酶溶液。

2.3.4 流动相 A: 精确吸取 1.0ml 三氟乙酸至 1000ml 水中, 混匀, 即得。

2.3.5 流动相 B: 量取 900ml 乙腈, 加水稀释至 1000ml, 精确加入 1.0ml 三氟乙酸, 混匀, 超声脱气 20 分钟, 即得。

2.3.6 20%乙腈: 量取 200ml 乙腈, 加水至 1000ml, 混匀, 超声脱气 20 分钟, 即得。

3 操作方法

3.1 仪器准备 开启高效液相色谱仪, 确认仪器处于可工作状态。将流动相管路 A、B 插入 20%乙腈中, 冲洗管路。安装以辛基硅烷键合硅胶 ($5\sim 10\mu\text{m}$) 为填充剂的色谱柱, 设置仪器流速为 1.0ml/min, 检测波长 214nm, 柱温 35°C , 进样器温度 6°C , 用 20%乙腈冲洗色谱柱至基线稳定。

进样前, 按照下列洗脱程序对色谱柱进行至少 1 个循环的平衡。

时间 (min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0	100	0
20	80	20
45	75	25
70	50	50
75	20	80

3.2 样品制备

3.2.1 对照品溶液：取 1 支重组人生长激素对照品，加入 500 μ l 0.05mol/L Tris 缓冲液，混合均匀，制得浓度为 2mg/ml 的溶液，吸取 300 μ l 此溶液、300 μ l 0.05mol/L Tris 缓冲液和 20 μ l 2mg/ml 胰酶溶液，混合均匀，置 37 $^{\circ}$ C 水浴中 4 小时后立即置 -20 $^{\circ}$ C 终止反应。

3.2.2 供试品溶液：取重组人生长激素原液样品适量，用 0.05mol/L Tris 缓冲液稀释成浓度为 2mg/ml 的样品溶液，同对照品溶液的后续配制方法操作，作为供试品溶液。

3.2.3 空白溶液：吸取 2mg/ml 的样品溶液 300 μ l，加入 320 μ l 0.05mol/L Tris 缓冲液，混合均匀，同对照品溶液的后续配制方法操作，作为空白溶液。

3.3 样品测定 取空白溶液、对照品溶液、供试品溶液各 100 μ l，分别注入液相色谱仪，按照 3.1 中的色谱条件和洗脱梯度进行测定。

4 结果判定

扣除空白溶液色谱峰后，供试品溶液的肽图谱应与对照品溶液的肽图谱一致。

起草人：李懿 王绿音 陈度宇

复核人：梁成罡 李晶

相关蛋白质检查法

1 原理

重组人生长激素第 149 位和第 152 位为天门冬酰胺，高温条件下易发生脱酰胺反应；第 14 位及第 125 位存在 2 个甲硫氨酸，在与氧气接触的条件下易被氧化成甲硫氨酸亚砷。脱酰胺产物、氧化产物及其他可能产生的相关蛋白质与原型蛋白存在极性的差异，通过反相色谱可以进行分离检测，以面积归一化法对相关蛋白质进行定量。

2 材料和设备

2.1 仪器设备 高效液相色谱仪、超声波清洗仪。

2.2 试剂 重组人生长激素对照品、盐酸、正丙醇、三羟甲基氨基甲烷。

2.3 溶液

2.3.1 0.05mol/L Tris 缓冲液：称取 12.114g 三羟甲基氨基甲烷，加入 1800ml 水，搅拌混合，用 1mol/L 盐酸调节 pH 值至 7.5，加水至 2000ml。

2.3.2 流动相：量取 1420ml 0.05mol/L Tris 缓冲液和 580ml 正丙醇，混合均匀，过滤，超

声脱气，试验中通过加入 0.05mol/L Tris 缓冲液或正丙醇微调，使主峰保留时间在 30~36 分钟之间。

3 操作方法

3.1 仪器准备 开启高效液相色谱仪，确认仪器处于可工作状态。将流动相管路 A 插入 20%乙腈中，冲洗管路。安装以丁基硅烷键合硅胶（5~10 μm ）为填充剂的色谱柱，设置仪器流速为 0.5ml/min，检测波长 220nm，柱温 45 $^{\circ}\text{C}$ ，进样器温度 6 $^{\circ}\text{C}$ ，用 20%乙腈冲洗色谱柱至基线稳定。

3.2 样品制备

3.2.1 空白溶液：以 0.05mol/L Tris 缓冲液作为空白溶液。

3.2.2 系统适用性溶液：取一支重组人生长激素对照品，加入 0.5ml 0.05mol/L Tris 缓冲液，得到浓度为 2mg/ml 的溶液，过滤除菌，室温放置 24 小时，作为系统适用性溶液。

3.2.3 供试品溶液：取重组人生长激素原液或注射液适量，用 0.05mol/L Tris 缓冲液稀释成浓度为 2mg/ml 的溶液，作为供试品溶液。

3.3 样品测定 取系统适用性溶液 20 μl ，注入液相色谱仪，记录色谱图，通过向流动相中添加 0.05mol/L Tris 缓冲液或正丙醇调节主峰保留时间在 30~36 分钟之间。调整到位后，判断所得系统适用性溶液色谱图是否符合相应要求。

系统适用性要求满足后，取空白溶液、供试品溶液各 20 μl ，分别注入液相色谱仪，记录色谱图至主峰保留时间 2 倍。

4 结果判定

4.1 系统适用性要求 重组人生长激素主峰与脱氨的重组人生长激素峰之间的分离度应不小于 1.0，重组人生长激素峰的拖尾因子应为 0.9~1.8。

4.2 限度要求 扣除空白溶液中的色谱峰，按面积归一化法计算，供试品溶液中总相关蛋白质不得过 6.0%。

起草人：李晶 李懿

复核人：梁成罡 张慧

含量测定法

1 原理

重组人生长激素易产生无活性的高分子聚合物，单体分子量为 22125。本法采用适合分离分子量为 5000~60000 球状蛋白的亲水改性硅胶为填充剂的分子排阻色谱柱分离重组人生长激素单体与多聚体，通过外标法对重组人生长激素的含量进行定量。

2 材料和设备

2.1 仪器设备 高效液相色谱仪。

2.2 试剂 无水合磷酸氢二钠、二水合磷酸二氢钠、异丙醇、重组人生长激素单体-二聚体对照品、重组人生长激素对照品。

2.3 溶液

2.3.1 0.063mol/L 磷酸盐缓冲液：称取无水磷酸氢二钠 10.36g，二水合磷酸二氢钠 9.54g，加水 1800ml 溶解，定容至 2000ml。

2.3.2 流动相：取 0.063mol/L 磷酸盐缓冲液 970ml，异丙醇 30ml，混匀过滤，超声脱气。

2.3.3 0.025mol/L 磷酸盐缓冲液：量取 0.063mol/L 磷酸盐缓冲液 100ml，加水稀释至 250ml，混合均匀，即得。

3 操作方法

3.1 仪器准备 开启高效液相色谱仪，确认仪器处于可工作状态。将流动相管路 A 插入超纯水中，冲洗管路。安装适合分离分子量为 5000~60000 球状蛋白的亲水改性硅胶为填充剂的分子排阻色谱柱（如 TSKgel G2000SWXL），设置仪器流速为 0.6ml/min，检测波长 214nm，柱温 25℃，进样器温度 6℃，用流动相冲洗色谱柱至基线稳定。

3.2 样品制备

3.2.1 空白溶液：以 0.025mol/L 磷酸盐缓冲液作为空白溶液

3.2.2 系统适用性溶液：取重组人生长激素单体-二聚体 1 支，加 0.025mol/L 磷酸盐缓冲液 0.5ml，制成 1mg/ml 的溶液，作为系统适用性溶液。

3.2.3 对照品溶液：取重组人生长激素标准品 2 支，每支加 1.0ml 0.025mol/L 磷酸盐缓冲液，制成 1.0mg/ml 的溶液，标记为 STD1 和 STD2。

3.2.4 供试品溶液

3.2.4.1 原液：解冻后翻转数次摇匀，置于室温下平衡 15 分钟，精确吸取适量，用 0.025mol/L 的磷酸盐缓冲液稀释，制成 rhGH 浓度约为 1mg/ml 的溶液，作为供试品溶液。

3.2.4.2 注射用制剂：取本品 5 瓶，分别加入 0.025mol/L 的磷酸盐缓冲液适量，使内容物溶解，将内容物全部转移至适宜容积的量瓶中，用适量 0.025mol/L 的磷酸盐缓冲液充分涮洗制剂瓶，完全转移至量瓶中，用 0.025mol/L 的磷酸盐缓冲液定容至刻度线，混匀，即得供试品溶液。

3.3 测定 取系统适用性溶液 20 μ l，注入液相色谱仪，记录色谱图，判断所得系统适用性溶液色谱图是否符合相应要求。

系统适用性溶液要求满足后，取空白溶液、对照品溶液、供试品溶液各 20 μ l，分别注入液相色谱仪，空白溶液进样 1 次，两份对照品溶液各连续进样 4 次，供试品溶液连续进样 2 次。记录色谱图至主峰保留时间 2 倍。

3.4 数据分析 积分对照品溶液和供试品溶液所得色谱图中的单体峰，按外标法计算得到供试品溶液中 rhGH 的浓度。

3.4.1 原液 乘以稀释倍数得到原液含量（mg/ml）。

3.4.2 注射用制剂 乘以定容体积计算 5 瓶包装中的含量总和，除以 5 得到每瓶的含量，再除以标示量，得到本品的百分含量。

4 结果判定

4.1 系统适用性要求 空白溶液色谱图中在主峰出峰处无干扰，系统适用性溶液所得色谱图中重组人生长激素单体峰与二聚体峰的分度应符合要求（峰高/峰谷 \geq 2.0）；8 针对照品溶液所得色谱图中主峰面积 RSD 应 \leq 2.0%。

4.2 限度要求

4.2.1 原液：报告结果。

4.2.2 注射用制剂：含重组人生长激素（ $C_{990}H_{1528}N_{262}O_{300}S_7$ ）应为标示量的90.0%~110.0%。

5 注意事项

溶液转移和定容时，小心轻柔的操作，避免产生液泡，干扰定容。

起草人：李懿 吕萍 王绿音

复核人：梁成罡 李晶

生物学活性测定法

1 原理

基于药物体内作用机制，即生长激素促动物机体生长和骨骼生长的药理药效作用，比较生长激素标准品与供试品的量效关系，对供试品进行赋值评价。体重法：以去垂体大鼠为动物模型，测定大鼠体重增加的程度，以决定供试品效价的一种方法。胫骨法：以去垂体大鼠为动物模型，测定大鼠胫骨骨骺板宽度增加的程度，以决定供试品效价的一种方法。

2 材料和设备

2.1 仪器和设备 天平〔分度值0.01mg（供试品称量用）、分度值1mg（试剂称量用）、分度值0.1g（大鼠称重用）〕、真空泵、带有测微尺的光学显微镜、60W台灯；手术板、手术剪、直镊、眼科剪、眼科直镊、眼科弯剪、牙科钻、钻头、抽滤瓶、真空泵、牙科刮勺、止血钳、刀片、载玻片、蜡板等手术器械。

2.2 动物 同一来源、品系，出生26~28天，体重60~80g，同一性别的健康大鼠，试验前2~3周无菌条件下，25%乌拉坦溶液（0.3ml/100gBW）腹腔注射麻醉，手术摘除脑垂体，迅速缝合，每只鼠编号记录体重作为体重参考值，于屏障环境中饲养使其恢复备用。

2.3 试剂

2.3.1 0.9%氯化钠溶液：称取氯化钠适量，加去离子水配成0.9%溶液。

2.3.2 牛血清白蛋白的0.9%氯化钠溶液：称取牛血清白蛋白适量，加0.9%氯化钠溶液配成0.1%的牛血清白蛋白的0.9%氯化钠溶液。

2.3.3 乌拉坦溶液：称取乌拉坦适量，加0.9%氯化钠溶液配成25%的乌拉坦溶液。

3 操作方法

3.1 样品制备

3.1.1 标准品溶液的配制与稀释：实验当日，取标准品，按标示效价加入含1%人血清白蛋白的0.9%氯化钠溶液，配制成高、低两种浓度的稀释液。

3.1.2 供试品溶液的配制与稀释：按供试品的标示效价或估计效价，同标准品溶液的配制方法，标准品及供试品相邻两浓度的比值应相等，一般比值 $r=1:0.25$ 。

3.2 测定方法 取去垂体手术后休息2~3周，体重变化小于手术后一周时 $\pm 10\%$ 的大鼠，按体重均匀分成4组，每组8只，分别自颈部皮下注射标准品和供试品高、低剂量稀释液0.5ml，

每日1次,连续6日。最后一次给药后24小时,二氧化碳窒息处死大鼠,对可疑大鼠可进行尸检,切开蝶鞍区,肉眼检查有无垂体残留,剔除有垂体残存的动物。体重法:计算各组每只动物给药后体重增加的克数为反应值。胫骨法:体重法实验结束后,处死的大鼠取下左右二只后腿,剪开皮肤及肌肉,剥离出胫骨并标号,将胫骨从近心端顶部中间沿矢状面切开并置10%甲醛保存,将胫骨水洗10分钟后,置丙酮中10分钟脱蛋白,将胫骨水洗3分钟,置2%硝酸银中染色2分钟,将染色后胫骨水洗一次后置水中,台灯下强光照射至变棕黑色,将变色后胫骨置10%硫代硫酸钠中固定30秒,将胫骨置80%乙醇中保鲜供测量用,将胫骨切片即沿剖面切1mm左右薄片,切片置光学显微镜下测量胫骨骨骺板宽度作为胫骨法的反应值。

3.3 数据分析 按《中国药典》2015年版四部通则1431生物检定统计法中的量反应平行线测定随机设计法列表的格式整理,按量反应平行线测定(2.2)法或(2.2.2)法随机设计处理结果,应用计算软件计算效价、实验误差。实验结果中出现的特大、特小等特异反应值,按《中国药典》规定判断其是否可以剔除,个别剂量组缺失的数据,如符合该附录要求,按所规定的方法补足。

4 结果判断

4.1 实验成立 可靠性测验应通过,即剂间、回归变异项非常显著,偏离平行不显著,否则实验结果不成立。对实验结果不成立者应做以下检查:检查实验操作包括溶液配制、注射、对实验动物的照顾等是否符合本法的实验要求。剂间、回归不显著,S、T反应不在对数剂量反应直线范围内,应根据反应结果,重新调整剂量复试。

4.2 实验误差 本法可信限率FL(%)不得大于50%,FL(%)超过者,可做以下处理:检查动物来源、实验操作、对动物的照顾等是否符合本法的实验要求,重复实验,按规定将几次实验结果合并计算,求得合并计算的效价及实验误差,应符合规定。

5 注意事项

5.1 取幼龄(体重60~80g)大鼠,以消除内源性生长激素的干扰;一般用雄性,较为敏感。

5.2 垂体切除术 麻醉:25%乌拉坦溶液(一般0.3ml/100gBW),要求浅麻,术后即能苏醒。钻孔:大鼠仰卧于大鼠架上,固定4肢及嘴部,沿颈部中线近下腭处,用剪刀剪一长约1cm的切口,将颌下腺向左右两侧分开,右侧处皮用止血镊夹住后,向外侧拉开,即可清楚见到覆盖于气管的胸甲状腺肌,在此肌左侧近咽部处,用眼科弯镊层层分离肌肉直到触及骨板,然后用牙科刮勺或用眼科弯镊夹住小棉球除净附着于骨板上的肌肉,在咽部正下方、左右两听囊之间,可触到一“T”形突起,用小棉球将“T”形附近及突起部位的肌肉全部擦干净,即可清楚地见到“T”形突起。在竖突起上有一条深蓝色横肉线(蝶枕软骨联合),在此横线上方1mm中间处用探针刺一小凹孔,然后将手钻(或牙科钻)固定于此凹孔处,轻轻旋转手钻,避免用力过度和下压,尤其在第一层骨片被钻破后,进行第二层骨片钻孔时,尤需注意。当手上感觉孔已钻通,即用一小针进入孔内试探,若无任何阻碍,则进行垂体吸取,钻孔应与横线相切。垂体吸取:将一端与抽气瓶相连的垂体吸取管对准钻孔,开动抽气泵,吸取垂体,待垂体吸出后,用棉球擦干血液,立即将皮肤切口缝合,并给动物编号、称重。同一批实验的动物,垂体切除术应在3天内完成。在切除手术过程中,如动物出现窒息现象,可立即用一玻璃吹管插入动物喉部,有节奏的向气管内吹气,进行抢救。环境:要求SPF级实验室,无菌空气二

级过滤,人工日光灯 12 小时自动照明,恒温、恒湿送风,温度 23~25℃,相对湿度 50%~55%。术后大鼠饲养于清洁级独立通风笼具(IVC)中,喂饲标准饲料并饮 5% 葡萄糖水至少 3 天。

5.3 剔除 去垂体手术后第 1 周为恢复期,从第 2 周起称重并记录,并每隔 1 天称重 1 次直至给药实验前,及时剔除掉体重变化大于手术后第 2 周的第一天体重 $\pm 10\%$ 的大鼠,即选择给药实验前大鼠体重变化小于手术后第 2 周的第一天体重 $\pm 10\%$ 的合格健康动物,按体重均匀随机分组。

5.4 腔骨法 切片、染色、测量实验条件应一致,用带有测微尺的光学显微镜测量骨髓板宽度。

起草人:李湛军 梁誉龄 孙悦

复核人:梁成罡 李晶

尼妥珠单抗注射液

简 述

尼妥珠单抗注射液是以表皮生长因子受体(EGFR)为靶点的重组人源化单克隆抗体,是中国第一个治疗恶性肿瘤的人源化单克隆抗体,人源化程度高达 95%以上。尼妥珠单抗能够竞争性结合 EGFR,阻断由 EGFR 与其介导的下游信号转导通路,从而抑制肿瘤细胞增殖、诱导分化、促进细胞凋亡、抑制肿瘤血管生成、增强放化疗疗效。尼妥珠单抗注射液已在 19 个国家上市。临床研究结果显示,尼妥珠单抗注射液联合放疗治疗晚期鼻咽癌的三年生存率达 84.3%,安全性良好,并获得了新药证书(国药证字 S20080001),于 2008 年上市销售,成为中国第一个在肿瘤靶向治疗领域拥有自主知识产权的药物,并作为鼻咽癌标准治疗药物写入了国际权威的《NCCN 头颈部肿瘤临床实践指南》。2015 年被收录于《中国药典》。

根据单抗制品关键质量属性、生产工艺理解认识的积累和风险评估的原则,来制定尼妥珠单抗的质量控制策略。制品检定采用的检测方法应经验证并符合要求。纳入质量标准的检定项目、可接受标准限度,应结合来自于临床前和临床研究多批样品的数据、用于证明生产一致性批次的的数据、稳定性等研究数据来综合确定。在质控中采用高度特异的、基于分子结构和(或)其他专属性的分析方法,对制品进行鉴别试验,尼妥珠单抗采用等电点、肽图、N 端氨基酸序列测定作为鉴别试验。在分子大小变异体分析中,采用分子排阻色谱法(SEC-HPLC)和毛细管凝胶电泳法(CE-SDS)进行单体、聚合体和片段定量分析。采用弱阳离子色谱法进行电荷变异体分析。利用杂交法对宿主细胞 DNA 进行控制,利用 ELISA 法对宿主细胞蛋白残留和蛋白 A 残留量进行测定。无菌检查、异常毒性检查和细菌内毒素含量是安全性指标。外观、澄清度、可见异物检查是对制品质量判断最直观、最快捷的检测方法。不溶性微粒检查是对静脉用

注射剂不溶性微粒数量和大小的测定。根据尼妥珠单抗作用机制和工作模式,采用人肺癌淋巴结转移细胞(H292)在不同浓度尼妥珠作用下生长情况不同的原理,检测尼妥珠单抗的生物学活性;依据不同浓度尼妥珠单抗与H292细胞结合情况不同,采用流式细胞术检测尼妥珠单抗相关结合活性。

毛细管等电聚焦法

1 原理

毛细管电泳法(CE)已成为当今生物制药产品开发和质量控制中一种不可或缺的分析手段。该法是指以弹性石英毛细管为分离通道,以高压直流电场为驱动力,根据供试品中各组分淌度(单位电场强度下的迁移速度)和(或)分配行为的差异而实现分离的一种分析方法。

目前,一些基于CE的方法也已运用到治疗性蛋白,特别是单抗的鉴定和纯度测定中,例如毛细管凝胶电泳法(CE-SDS)和毛细管区带电泳法(CZE)或毛细管等电聚焦法(CIEF),前者根据流体半径实现分离,后者根据电荷异质性实现分离。单抗在生产过程中和储存期间可能会发生电荷的变化,这是它的一个重要特性,而毛细管等电聚焦法(IEF)是一种非常有效的测量单抗电荷异质性的方法。

毛细管等电聚焦法(CIEF)采用涂层毛细管进行分离,将供试品和两性电解质混合进样,两个电极槽中分别加入酸液和碱液,施加电压后,毛细管中的操作电解质溶液逐渐形成pH梯度,各溶质在毛细管中迁移至各自的等电点(pI)时变为中性,进而形成聚焦的区带,而后用压力或改变检测器末端电极槽储液pH值的方法使溶质通过检测器进行检测。

2 材料和仪器

2.1 材料和试剂

2.1.1 CIEF Peptide Marker 试剂盒、CIEF 凝胶、中性毛细管(50 μ m i.d. \times 45cm)、精氨酸、两性电解质(3-10)、亚氨基二乙酸、尿素、冰醋酸、1mol/L 氢氧化钠、80%磷酸、5 μ m 膜过滤器、0.2 μ m 膜过滤器、30K 离心过滤装置。

2.1.2 阳极稳定剂:称取0.27g 亚氨基二乙酸,加入去离子水溶解,定容至10ml。

2.1.3 阴极稳定剂:称取0.87g 精氨酸,加入去离子水溶解,定容至10ml。

2.1.4 3mol/L 尿素-胶:称取1.80g 尿素,加入CIEF 胶旋转至溶解,定容至10ml。然后用5.0 μ m 的微膜过滤器过滤。

2.1.5 阳极电解液:量取685 μ l 的85%磷酸,加入去离子水混匀,定容至50ml。

2.1.6 阴极电解液:量取15ml 1mol/L NaOH 溶液,加入去离子水混匀,定容至50ml。

2.1.7 迁移剂:量取1ml 冰醋酸,加入去离子水混匀,定容至50ml。

2.1.8 尿素溶液:称取10.8g 尿素,加入去离子水溶解,定容至50ml。然后用5.0 μ m 的微膜过滤器过滤。

2.2 仪器 毛细管电泳仪、离心机、涡旋混合器。

3 操作方法

3.1 样品制备

3.1.1 在样品制备之前打开紫外灯,仪器预热1小时左右。

3.1.2 参考品和样品脱盐处理：加入 500 μ l IgG 样品于 30kD 的超滤器中，14000g 离心 15 分钟；将超滤器按反方向插入一个新离心管中于 1000g 离心 2 分钟，将收集到的 IgG 转移到合适的样品管中，加入去离子水至最终浓度为 6mg/ml。

3.1.3 按如下制备样品混合液（注：“x+1”是指每制备一份样品需按多出 1 个样品数来算，然后乘以每个试剂所用体积）

试剂	样品体积 (μ l)	样品数量
3mol/L 尿素-胶	200	x+1
两性电解质溶液 3-10	12	x+1
阴极稳定剂	20	x+1
阳极稳定剂	2	x+1
等电点标准品 9.5	2	x+1
等电点标准品 7.0	2	x+1
等电点标准品 5.5	2	x+1

3.1.4 将混合后的溶液涡漩 15 秒，以确保完全混匀。

3.1.5 移取 240 μ l 混合液和 10 μ l 浓度约为 6mg/ml 的蛋白溶液。

3.1.6 涡漩样品 15 秒，小心吸取 200 μ l 于样品管中，低速离心 20 秒。

3.1.7 盖紧蓝色瓶盖，然后将样品瓶放置于样品托盘中。

3.2 测定

3.2.1 毛细管电泳分析参数及运行方法

3.2.1.1 毛细管电泳参数设置

毛细管长度	至检测器长：21cm；总长：31cm
运行电压	30kV
温度	毛细管/供试品：20 $^{\circ}$ C/10 $^{\circ}$ C
进样参数	Electrophoretic: 25kV; Reduced sample: 99 Sec
运行时间	47.3min
检测器	UV 280nm
孔屏大小	2 (200 μ m)

3.2.1.2 分离方法

Time (min)	Event	Value	Duration	Inlet Vial	Outlet Vial	Summary
---	Rinse-Pressure	50.0psi	3.00 minutes	BI: D1	BO: E1	Forward
---	Rinse-Pressure	50.0psi	2.00 minutes	BI: B1	BO: B1	Forward

续表

Time (min)	Event	Value	Duration	Inlet Vial	Outlet Vial	Summary
---	Rinse - Pressure	25.0psi	99.0sec	SI: A1	BO: B1	Override Forward
---	Wait	---	0.00 minutes	BI: A1	BO: A1	NA
0.00	Separate Voltage	25.0kV	15.00 minutes	BI: C1	BO: C1	0.17min ramp, normal polarity
15.00	Separate Voltage	30.0kV	30.00 minutes	BI: C1	BO: D1	0.17min ramp, normal polarity
45.00	Stop data	---	---	---	---	---
45.10	Rinse - Pressure	50.0psi	2.00 minutes	BI: A1	BO: B1	Forward
47.20	Wait	---	0.00 minutes	BI: A1	BO: A1	NA
47.30	End	---	---	---	---	---

3.2.2 毛细管调试和关机冲洗

毛细管调试冲洗方法

Event	Value	Duration	Inlet Vial	Outlet Vial	Summary	Comments
Rinse - Pressure	50.0psi	5.00 minutes	BI: F1	BO: B1	Forward	Chemical Mobilizer rinse
Rinse - Pressure	50.0psi	5.00 minutes	BI: B1	BO: B1	Forward	DDI H ₂ O rinse
Rinse - Pressure	50.0psi	5.00 minutes	BI: E1	BO: B1	Forward	cIEF Conditioning Gel
Wait	---	0.00 minutes	BI: A1	BO: A1	---	Idle Position

毛细管关机冲洗方法

Event	Value	Duration	Inlet Vial	Outlet Vial	Summary	Comments
Rinse - Pressure	50.0psi	2.00 minutes	BI: B1	BO: B1	Forward	DDI H ₂ O rinse
Rinse - Pressure	50.0psi	5.00 minutes	BI: E1	BO: B1	Forward	Gel rinse
Lamp - Off	---	---	---	---	---	Turn off lamp
Wait	---	0.00 minutes	BI: A1	BO: A1	---	Idle Position

3.3 数据分析 积分由蛋白质产生的所有的峰。使用 Karat 软件进行自动积分，自动积分参数如下表。稍有变异情况下，可对积分参数进行调整，包括手动积分和基线调整。

Event	Start time	Stop time	Value
Width	0.00	0.00	0.3
Threshold	0.00	0.00	1000
Shoulder sensitivity	---	---	9999
Integration Off	0.00	15.00	0.00

4 结果判定

4.1 系统适用性要求 标准品 Marker 的等电点和迁移时间应呈线性关系，且相关系数 R^2 应大于 0.99。

4.2 供试品合格标准 供试品的等电点图谱应与标准品一致。

5 注意事项

5.1 部分试剂加入量较低，应涡漩足够时间确保混合均匀。

5.2 将混合溶液加入样品管中时，确保无气泡，以免影响上样。

起草人：孙亮

复核人：王兰

肽图检查法

1 原理

肽图检查法是一种采用作用于特异性位点的内切酶将蛋白质供试品消化为肽段的分析工具。随后采用色谱方法将这些肽段分离，获得独特类型的峰作为指纹图谱，通过与蛋白质标准品肽图相比较对蛋白质供试品进行鉴别。

丙酮使蛋白质沉淀，盐酸胍使蛋白质变性，通过二硫苏糖醇（DTT）还原二硫键，随后使用碘乙酸钠（IAA）进行烷基化反应。脱盐柱对处理后的样品进行脱盐，采用测序级胰蛋白酶消化，所获得的肽段在 RP-HPLC C18 柱上利用乙腈（ACN）梯度程序进行洗脱，并采用吸光度法（214nm）进行监测。

2 材料和设备

2.1 材料和试剂 6mol/L 尿素溶液（称取 180.2g 尿素，3.0285g Tris，0.0735g CaCl_2 ，加 400ml 超纯水溶解，用浓盐酸调 pH 值为 8.1，加水定容至 500ml 混匀），1mol/L 尿素溶液（取 100ml 6mol/L 尿素溶液和 500ml Tris 溶液，混匀），盐酸胍溶液（称取 196.6g 盐酸胍，3.0g Tris，0.0735g CaCl_2 ，加 400ml 超纯水溶解，用浓盐酸调 pH 值为 8.1，加水定容至 500ml，混匀），1mol/L DTT 溶液（称取 72mg DTT 溶于 500 μl 超纯水。），1mol/L IAA 溶液（称取 104mg 碘乙酸钠溶于 500 μl 超纯水。），酶切缓冲液（50mmol/L 三羟甲基氨基甲烷，1mmol/L 氯化钙，1mol/l 尿素，pH 8.1），超纯水，胰蛋白酶溶液（稀释成浓度为 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ），丙酮（分析纯），流动相 A 液（0.1% 三氟乙酸水溶液），流动相 B（0.1% 三氟乙酸-90% 乙腈水溶液），尼妥珠单抗标准品。Hitrap Column Pharmacia 5ml 脱盐柱（GE Healthcare），色谱柱（以四烷基硅烷键合硅胶为填充剂，如：

Vydac C4 柱, 25cm×4.6mm, 粒度 5 μ m 或其他适宜的色谱柱)。

2.2 仪器设备 离心机、温浴系统、高效液相色谱仪。

3 操作方法

3.1 样品处理 分别取 2.5mg 供试品与标准品, 各加入 1ml 冷却至 -20℃ 的丙酮, 混匀, -20℃ 下放置 20 分钟, 3500 转/分钟离心 5 分钟, 弃去上清, 晾干。加 500 μ l 盐酸胍溶液, 复溶沉淀。加 25 μ l DTT 溶液, 70℃ 水浴 30 分钟。加 60 μ l IAA 溶液, 混匀后室温避光 45 分钟。加 15 μ l DTT 溶液终止反应。平衡 Hitrap 脱盐柱后, 用 1ml 注射器吸取样品, 收集 1.5ml 含有样品的溶液, 用紫外法检测所收集溶液的浓度。按蛋白和胰蛋白酶质量比例为 50:1 进行酶切, 37℃ \pm 0.5℃ 孵育 16 小时, 每个样品中加入 50 μ l 色谱流动相 A, 终止反应。上样前每分钟 16000 转离心 15 分钟, 取上清液作为供试品溶液。

3.2 样品检测 色谱条件: 柱温为 35℃ \pm 0.5℃; 流速为每分钟 0.8ml; 检测波长为 214nm; 进样 20 μ l/50 μ g。按下表进行梯度洗脱。记录供试品及标准品色谱图。

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	100	0
3	100	0
30	73	27
76	50	50
78	0	100
85	0	100
88	100	0
120	100	0

4 结果判定

将供试品溶液的肽图谱与标准品溶液的肽图谱进行比较。供试品肽图谱应与尼妥珠单抗标准品一致。

起草人: 武刚

复核人: 王兰

分子排阻色谱法

1 原理

分子排阻色谱法是一种利用以凝胶为填料的色谱柱对不同大小的单抗分子进行分离, 用于单抗单体含量测定的常规检测方法, 其目的是对抗多聚体及降解产物进行控制。其中多聚体含量是治疗性单抗的一个非常重要的质量属性, 多聚体含量的增加会导致抗体免疫原性的增加, 从而降低疗效和体内的半衰期, 严重时影响产品的安全性, 因此相关质量参数必须得到严

格的控制。

2 试剂和仪器

2.1 试剂 PBS 溶液（流动相）：称取 NaCl 5.85g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 35.8g, 900ml 纯净水溶解，用 HCl 调 pH 值为 6.7，定容至 1L。0.22 μm 亲水滤膜过滤，超声脱气 30 分钟，待用。

2.2 仪器 高效液相色谱仪（HPLC）。

3 操作方法

3.1 供试品稀释 用 PBS 溶液把供试品稀释成 4mg/ml，混匀，离心数秒，使管壁上的溶液到达管底。

3.2 标准品稀释 用配方液把标准品稀释成 4mg/ml，将其浓度作为 100%，将 100% 的标准品稀释 20 倍，作为 5% 的标准品，所有稀释好的标准品分别混匀，离心数秒，使管壁上的溶液到达管底。

3.3 高效液相色谱操作 按照仪器操作规程启动电脑，启动 LC 实时分析界面。

3.3.1 脱气、安装和平衡柱子：打开自动脱气按钮，使系统进行自动脱气。自动脱气后关闭排气阀，根据仪器操作规程安装和平衡柱子，载入方法。当基线和压力都稳定时，进行上样。

3.3.2 根据仪器操作规程，进行编辑样品序列，上样顺序为空白样、标准品、供试品、标准品。

3.3.3 将标准品和供试品置于自动上样板上，进行批处理分析。

3.3.4 液相检测方法参数如下。

检测波长	280nm
流速	1ml/min
柱温	25℃
最大压力	7.0MPa
上样量	100 μg (25 μl)
分析时间	20min

4 结果判定

4.1 数据分析 运用面积归一法计算单克隆抗体中单体含量。

4.2 系统适用性 所有供试品的理论板数应大于 2000，抗体二聚体和单体的分离度应大于 1.5。

4.3 合格标准 单体含量不小于 95.0%。

起草人：李萌

复核人：王兰

弱阳离子色谱法

1 原理

尼妥珠单抗在生产的过程中的主要修饰是轻链 N-端焦谷氨酸修饰和重链 C-端的赖氨酸截断, 这些修饰可改变单抗的表面电荷分布特性。离子交换色谱是采用高压输液泵系统将规定的洗脱液泵入装有填充剂的色谱柱对可解离物质进行分离测定的色谱方法。注入的供试品由洗脱液带入色谱柱内进行分离后, 进入检测器(必要时经过抑制器或衍生系统), 然后由积分仪或数据处理系统记录并处理色谱信号。它的分离机制主要为离子交换, 即基于离子交换色谱固定相上的离子与流动相中具有相同电荷的溶质离子之间进行的可逆交换, 可根据尼妥珠单抗各组分所带电荷的不同将其分开, 鉴定其纯度和杂质。

2 试剂和仪器

2.1 试剂 超纯水 $\geq 18.2M\Omega$, 氯化钠, 磷酸氢二钠, 磷酸二氢钠均为分析纯。

2.1 仪器 高效液相色谱仪 HPLC: 色谱柱为弱阳离子交换柱(WCX-10, 4mm \times 250mm)。

3 操作方法

3.1 溶液配制

3.1.1 1mol/L 氯化钠溶液: 称取 NaCl 116.90g, 溶于 2.0L 超纯水中。

3.1.2 200mmol/L 磷酸氢二钠: 称取 $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 71.62g, 加 500ml 超纯水溶解, 定容至 1L。

3.1.3 200mmol/L 磷酸二氢钠: 称取 $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 31.20g, 加 500ml 超纯水溶解, 定容至 1L。

3.1.4 10mmol/L 磷酸钠(流动相 A): 精密量取 200mmol/L Na_2HPO_4 61.0ml, 200mmol/L NaH_2PO_4 39.0ml, 1900ml 水, 混匀;

3.1.5 10mmol/L 磷酸钠, 0.5mol/L 氯化钠(流动相 B): 精密量取 200mmol/L Na_2HPO_4 61.0ml, 200mmol/L NaH_2PO_4 39.0ml, 1mol/L NaCl 1.0L, 900ml 水, 混匀。

3.2 实验过程 用 A 相将供试品和标准品分别稀释至每 1ml 中约含 0.5mg, 作为供试品溶液和标准品溶液, 取供试品溶液和标准品溶液各 60 μ l, 分别注入液相色谱仪, 按下表进行梯度洗脱。

时间(分钟)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0	100	0
5	100	0
6	98	2
50	92	8
51	25	75
60	25	75
60.1	100	0
90	100	0

4 结果判定

供试品图谱应与标准品的一致。

起草人：俞小娟

复核人：王兰

毛细管凝胶电泳法

1 原理

毛细管电泳法（CE）已成为生物制药产品开发和质量控制中一种不可或缺的工具。该方法是指以弹性石英毛细管为分离通道，以高压直流电场为驱动力，根据供试品中各组分淌度（单位电场强度下的迁移速度）和（或）分配行为的差异而实现分离的一种分析方法。目前一些基于 CE 的方法也已经运用到治疗性蛋白特别是单抗的纯度测定中，例如毛细管凝胶电泳（CE-SDS），是根据流体半径不同实现分离，具体分为还原型凝胶电泳和非还原型凝胶电泳。

CE-SDS 的原理为，将聚丙烯酰胺在毛细管中交联生成网状多孔凝胶，以凝胶作为载体进行电泳。由于凝胶多孔，具有类似分子筛的作用，荷质比相等但大小不同的分子，在电场作用下发生迁移，其迁移速度受到凝胶网状结构的阻碍。大分子受到的阻力大，迁移速度慢，小分子受到的阻力小，迁移速度快，从而达到相互分离。

2 材料和仪器

2.1 材料和试剂

2.1.1 SDS-MW 分析试剂盒（SDS-MW Gel Buffer、SDS-MW Sample Buffer、酸性冲洗溶液、碱性冲洗溶液）、熔融石英毛细管（31cm×50μm I.D.）、碘乙酰胺（用于非还原 CE-SDS）、2-巯基乙醇（用于还原 CE-SDS）、30K 离心过滤装置。

2.1.2 0.8mol/L 碘乙酰胺 称取 74mg 碘乙酰胺，溶解在 500μl 超纯水中。

2.2 仪器设备 毛细管电泳仪、离心机、涡漩混合器、水浴锅。

3 操作方法

3.1 供试品溶液制备

3.1.1 在供试品制备之前打开紫外灯，使仪器预热 1 小时左右。

3.1.2 供试品溶液制备：用 SDS 缓冲液将供试品稀释至 1mg/ml。供试品缓冲液以相同稀释倍数稀释，作为空白对照。

3.1.3 非还原供试品溶液制备：取供试品溶液（1mg/ml）95μl，加入 0.8mol/L 碘乙酰胺水溶液 5μl，涡漩混匀。取空白对照 95μl，加入 0.8mol/L 碘乙酰胺水溶液 5μl，涡漩混匀，为非还原空白对照。

3.1.4 还原供试品溶液制备：取供试品溶液（1mg/ml）95μl，加入 2-巯基乙醇 5μl，涡漩混匀。取空白对照 95μl，加入 2-巯基乙醇 5μl，涡漩混匀，为还原空白对照。

3.1.5 盖紧瓶盖，将混合后的供试品于 70℃ 水浴，加热 5 分钟（非还原）/15 分钟（还原）。

- 3.1.6 供试品冷却至室温，6000 转/分钟（3306g）离心 1 分钟。
 3.1.7 小心吸取 75 μ l 供试品和空白于 PCR 样品管中，应避免气泡。
 3.1.8 盖紧蓝色瓶盖，然后将供试品瓶放置于供试品托盘中。

3.2 测定方法

3.2.1 毛细管电泳分析参数及运行方法

毛细管电泳参数设置

毛细管长度	至检测器长：21cm；总长：31cm
运行电压	15kV
温度	毛细管/样品盘：20 $^{\circ}$ C/20 \pm 2 $^{\circ}$ C
进样参数	Electrophoretic: 10kV Non-reduced sample: 40Sec Reduced sample: 30Sec
运行时间	40min
检测器	UV 214nm
孔塞大小	8 (100 \times 800 μ m)

分离方法

Time (min)	Event	Value	Duration	Inlet Vial	Outlet Vial	Summary
NA	Rinse-Pressure	60.0psi	3.00min	Basic wash (BI: D1) or (BI: D2) *	Waste (BO: D1) or (BO: D2) *	Forward
NA	Rinse-Pressure	60.0psi	2.00min	Basic wash (BI: D1) or (BI: D2) *	Waste (BO: E1) or (BO: E2) *	Forward
NA	Rinse-Pressure	70.0psi	1.00min	Acid wash (BI: E1) or (BI: E2) *	Waste (BO: E1) or (BO: E2) *	Forward
NA	Rinse-Pressure	70.0psi	1.00min	Water (BI: F1) or (BI: F2) *	Waste (BO: E1) or (BO: E2) *	Forward
NA	Rinse-Pressure	50.0psi	15.00min	Waste for gel loading (BI: C1) or (BI: C2) *	SDS Gel Buffer (BO: C1) or (BO: C2) *	Reverse
NA	Wait	NA	0sec	Purified water (BI: A3)	Purified water (BO: A3)	NA
NA	Inject-Voltage	10kV	Non-reduced sample: 40sec Reduced sample: 30sec	Sample (SI: A1)	SDS Gel Buffer (BO: B1) or (BO: B2) *	Override, Reverse polarity
NA	Wait	NA	0sec	Purified water (BI: A2)	Purified water (BO: A2)	NA

续表

Time (min)	Event	Value	Duration	Inlet Vial	Outlet Vial	Summary
NA	Wait	NA	0sec	Purified water (BI: A1)	Purified water (BO: A1)	NA
0.0	Separate-Voltage	15kV	40.00min	SDS Gel Buffer (BI: B1) or (BI: B2) *	SDS Gel Buffer (BO: B1) or (BO: B2) *	1.0min ramp, Reverse polarity, both (apply 20psi pressure during separation)
5.0	Auto zero	NA	NA	NA	NA	NA
40.0	End	NA	NA	NA	NA	NA

3.2.2 毛细管调试和关机冲洗

毛细管调试冲洗方法

Time (min)	Event	Value	Duration	Inlet Vial	Outlet Vial	Summary
0.0	Separate-Pressure	60.0psi	6.0min	Basic wash (BI: F6)	Waste (BO: F5)	Forward
0.0	Autozero	---	---	---	---	---
6.0	Separate-Pressure	60.0psi	4.0min	Basic wash (BI: F6)	Waste (BO: F6)	Forward
10.0	Separate-Pressure	70.0psi	2.0min	Acid wash (BI: F5)	Waste (BO: F6)	Forward

毛细管关机冲洗方法

Time (min)	Event	Value	Duration	Inlet Vial	Outlet Vial	Summary
0.0	Separate-Pressure	60.0psi	6.0min	Basic wash (BI: F6)	Waste (BO: F5)	Forward
0.0	Autozero	---	---	---	---	---
6.0	Separate-Pressure	60.0psi	4.0min	Basic wash (BI: F6)	Waste (BO: F6)	Forward
10.0	Separate-Pressure	70.0psi	2.0min	Acid wash (BI: F5)	Waste (BO: F6)	Forward
12.0	Separate-Pressure	70.0psi	2.0min	Purified water (BI: F4)	Waste (BO: F6)	Forward
14.0	Wait	---	0.0sec	Purified water (BI: A1)	Waste (BO: A1)	---
14.0	Lamp-Off	---	---	---	---	---
14.0	Stop Data	---	---	---	---	---

4 结果判定

4.1 积分由蛋白质产生的所有的峰,不包括试剂空白电泳图谱中存在的任何峰。使用 Karat 软件进行自动积分,自动积分参数如下表。稍有变异情况下,可对积分参数进行调整,包括手动积分和基线调整。

Event	Value
Width	0.2
Threshold	80

4.2 系统适用性要求

4.2.1 非还原 供试品溶液的电泳图谱应与提供的典型电泳图谱相一致; IgG 主峰与片段的分离度应大于 0.8; 供试品主峰的修正峰面积百分比 (CPA) 的 RSD 值应 ≤ 0.8 。

4.2.2 还原 供试品溶液的电泳图谱应与提供的典型电泳图谱相一致; 糖基化重链和非糖基化重链的分离度应大于 1.0; 供试品重链和轻链之和的修正峰面积 CPA_{LC+HC} 的 RSD 值应 ≤ 0.8 。

4.3 合格标准

4.3.1 非还原: 单体含量应大于 92.0%。

4.3.2 还原: 重链及轻链之和 $\geq 90.0\%$ 、非糖基化重链 $\leq 5.0\%$ 。

5 注意事项

5.1 部分试剂加入量较低,应涡漩足够时间确保混合均匀。

5.2 将混合溶液加入供试品管中时,确保无气泡,以免影响上样。

5.3 水浴时间需掌握准确,以免影响供试品最终分离效果。

起草人: 李萌

复核人: 玉兰

蛋白质含量检测方法 (紫外-可见分光光度法)

1 原理

吸收光谱是物质中的分子和原子吸收了入射光中的某些特定波长的光能量,相应地发生了分子振动能级跃迁和电子能级跃迁的结果。由于各种物质具有各自不同的分子、原子和不同的分子空间结构,其吸收光能量的情况也就不会相同,因此,每种物质就有其特有的、固定的吸收光谱。

紫外分光光度计法是在紫外光波长范围内测定某种物质的吸收光谱,进而研究物质的成分、含量、结构以及物质间相互作用。已经证实,含有苯环的芳香族氨基酸在 280nm 下有最大吸收峰。

尼妥珠单抗是由一系列氨基酸按照核酸序列翻译生成的具有生物活性的蛋白,它的组成中含量不同的芳香族氨基酸,但芳香族氨基酸的组成和数量是固定的,故在 280nm 下的吸收值与

蛋白含量成线性关系。基于以上特征，尼妥珠单抗的蛋白浓度测定利用其在 280nm 下的吸光度进行测定，计算公式为：

尼妥珠单抗浓度 = 280nm 处的吸光度 (OD₂₈₀) × 稀释倍数 / 尼妥珠单抗消光系数

式中，消光系数：尼妥珠单抗的消光系数通过凯氏定氮法测定物质对光吸收值的大小，不同物质具有不同的消光系数。

2 材料和设备

2.1 材料和试剂 成品制剂缓冲液，用于供试品的稀释。

2.1 设备 分光光度计。

3 操作方法

3.1 使用前半小时开启分光光度计，将波长调至 280nm。

3.2 用相应稀释缓冲液作为空白调零。

3.3 用稀释缓冲液将供试品平行稀释三次，测定蛋白溶液的吸光度。

3.4 通过以下公式计算蛋白浓度：

浓度 = 蛋白吸光度 × 稀释倍数 ÷ 消光系数

4 结果判定

4.1 系统适用性 使用标准品作为系统适用性检测的内控样品，重复检测 3 次，标准品吸光度应为 0.3~0.88，样品浓度应在 5.08~5.20mg/ml，变异系数不大于 2.0%。

4.2 合格标准 稀释供试品的吸光度范围应为 0.3~0.88。三个平行稀释供试品吸光度变异系数不大于 5.0%。供试品浓度应符合相应质量标准。

5 注意事项

如果供试品的吸光度大于 1.0，应该置于室温下，用制剂缓冲液来稀释蛋白质。

起草人：李萌

复核人：王兰

生物学活性测定法（一）——相对结合活性

1 原理

抗体药物的生物活性直接反映了其临床应用的体内效力，是抗体药物质量控制的重要指标。目前抗体药物的活性分析主要是体外检测，其中基于细胞的分析方法由于其具有操作简便、周期短、特异性好、变异度小等优点得到广泛应用。

流式细胞术 (Flow Cytometry, FCM) 是对悬液中的单细胞或其他生物粒子，通过检测标记的荧光信号，实现高速、逐一的细胞定量分析和分选的技术。本法系依据不同浓度尼妥珠单抗注射液与人肺癌 H125 细胞结合情况不同，用流式细胞术检测尼妥珠单抗注射液相对结合活性。

2 材料和仪器

2.1 材料

2.1.1 用具 微量移液器 (1000 μ l、200 μ l、100 μ l)。

2.1.2 试剂

2.1.2.1 RPMI 1640 培养液: 取 RPMI 1640 培养液粉末 1 袋 (规格为 1L), 加水溶解并稀释至 1000ml, 加青霉素 10^5 IU 和链霉素 10^5 IU, 加碳酸氢钠 2.1g, 溶解后, 混匀, 除菌过滤, 4°C 保存。或用商品化的 RPMI 1640 溶液。

2.1.2.2 细胞培养液: 取胎牛血清 (FBS) 10ml, 加 RPMI 1640 培养液 90ml, 4°C 保存。

2.1.2.3 $10\times$ 磷酸盐缓冲液 (PBS): 取三水合磷酸氢二钾 19.7068g, 二水合磷酸二氢钠 3.4328g, 氯化钠 14.4g, 超纯水 200ml 溶解。

2.1.2.4 PBS: 取 $10\times$ PBS100ml, 用超纯水稀释到 1000ml。

2.1.2.5 0.25%乙二胺四乙酸二钠 (EDTA) - 胰酶: 商品化 0.25%EDTA - 胰酶。

2.1.2.6 10%叠氮钠: 取叠氮钠 0.10g, 加 1ml 超纯水溶解。

2.1.2.7 稀释液: 取牛血清白蛋白 0.10g, 10%叠氮钠 100 μ l, PBS 10ml, 混匀。

2.1.2.8 1%多聚甲醛溶液: 取多聚甲醛 5g, 1mol/L 氢氧化钠溶液 250 μ l, 加 $10\times$ PBS 50ml, 混匀, 用水定容至 500ml。

2.1.2.9 抗人异硫氰酸荧光素: (FITC) 稀释溶液 取抗人 FITC 抗体溶液适量, 用稀释液进行 1:20~1:30 稀释。

2.2 仪器 流式细胞仪。

3 操作方法

3.1 样品制备

3.1.1 标准品溶液的制备 取尼妥珠单抗标准品, 用稀释液稀释至 50、15、5.0、3.0、2.0、1.0、0.50、0.20 和 0.05 μ g/ml, 1.0 μ g/ml 和 3.0 μ g/ml 稀释度做 2 管, 其他浓度做 1 管。

3.1.2 供试品溶液的制备 取供试品, 用稀释液稀释至 50、15、5.0、3.0、2.0、1.0、0.50、0.20 和 0.05 μ g/ml, 1.0 μ g/ml 和 3.0 μ g/ml 稀释度做 2 管, 其他浓度做 1 管。

3.2 测定 H125 细胞用完全培养液于 37°C , 5%二氧化碳条件下培养, 使用解冻或传代 H125 细胞 (控制传代细胞浓度为每 1ml 含 $1.0\times 10^5\sim 5.0\times 10^5$ 个细胞) 用于生物学相对结合活性测定, 细胞活力 80%以上。弃去培养瓶中的培养液, 0.25% EDTA - 胰酶消化后, 于 4°C 离心 5 分钟, 弃去上清, 收集细胞并计数, 细胞活力 (活细胞数占细胞总数的百分比) 应不小于 80%。用 10ml PBS 洗涤细胞 2 次后, 用 PBS 配成每 1ml 含有 1×10^7 个细胞的细胞悬液。取适宜规格离心管数支, 向各离心管加入 20 μ l 不同浓度标准品或供试品溶液, 其中 2 管加入 20 μ l 稀释液作为空白对照。向含有不同浓度的标准品溶液、供试品溶液和空白对照溶液的离心管中加入 25 μ l 细胞悬液, 混匀, 4°C 下保温 30 分钟。向每个离心管中加入 700 μ l PBS, 于 4°C 离心 5 分钟。小心弃去上清液, 在涡旋振荡器上轻轻振荡。向每个离心管中加入 20 μ l 抗人 FITC 稀释溶液 (2 管空白对照中的 1 管: 加入 20 μ l 稀释抗人 FITC 所用的稀释液), 混匀。 4°C 下保温 30 分钟。向每个离心管中加入 700 μ l PBS, 于 4°C 离心 5 分钟, 小心弃去上清液, 在涡旋振荡器上轻轻振荡。向每个管中加入 1%多聚甲醛溶液 500 μ l。用流式细胞仪读取细胞平均荧光强度, 记录测定结果。

3.3 数据分析 采用计算机程序或四参数回归算法进行处理,以标准品或供试品对数浓度为横坐标,以荧光强度为纵坐标,使用限制模式(最大值、最小值、斜率一致)统计计算供试品和标准品的半效浓度(ED_{50}),按下式计算结果

$$\text{供试品相对结合活性} = \text{标准品 } ED_{50} \div \text{供试品 } ED_{50} \times 100\%$$

4 结果判定

4.1 系统适应性 S形曲线平行假设未被否决(P 值 >0.05),且曲线拟合度 R^2 应大于0.97。

4.2 样品合格标准 供试品相对结合活性应不低于标准品的60%;供试品相对结合活性合格标准:供试品相对结合活性应为标准品的60%~140%。

5 注意事项

5.1 确认 H125 细胞状态良好,细胞活力(活细胞数占细胞总数的百分比)应不小于80%。

5.2 注意各试剂混合后的孵育温度。

起草人:孙亮

复核人:王兰

生物学活性测定法(二)——H292 细胞增殖抑制法

1 原理

活性测定是对抗体类药物的有效成分和含量及药物效价的测定,是确保药物有效性的重要质控指标。抗体药物的生物学活性测定,一般采用体外细胞法或动物模型法模拟药物的体内作用机制,并通过与活性标准品的比较对其量效关系进行赋值评价。常用生物活性测定方法主要有细胞增殖抑制法、细胞毒性法、抗体依赖性细胞介导的细胞毒性法和补体依赖的细胞毒性法等。目前抗体药物的活性分析方法主要是体外检测,其中基于细胞的分析方法由于其具有操作简单、周期短、特异性好、变异度小等优点得到广泛应用。

针对生长因子靶点的抗体药物多是采用细胞增殖抑制的方法来反映抗体的生物学活性,包括抗血管内皮生长因子(VEGF)单抗、抗人表皮生长因子受体2(HER2)单抗及抗人表皮生长因子受体(EGFR或HER1)单抗等。抗EGFR靶点单抗也是通过特异结合并封闭表皮生长因子受体,有效抑制肿瘤细胞生长,如DiFi细胞、A431细胞增殖抑制法等。本法系依据人肺癌淋巴结转移细胞(H292)在不同浓度尼妥珠单抗注射液作用下生长情况不同,检测尼妥珠单抗注射液的生物学活性。

2 试剂和仪器

2.1 试剂

2.1.1 RPMI 1640 培养液:取 RPMI 1640 培养液粉末 1 袋(规格为 1L),加水溶解并稀释至 1000ml,加青霉素 10^5 IU 和链霉素 10^5 IU,加碳酸氢钠 2.1g,溶解后,混匀,除菌过滤,4℃保存,或用商品化的 RPMI 1640 溶液。

2.1.2 维持培养液:取胎牛血清(FBS)1ml,加 RPMI 1640 培养液 99ml,4℃保存。

2.1.3 完全培养液:取胎牛血清(FBS)10ml,加 RPMI 1640 培养液 90ml,4℃保存。

2.1.4 磷酸盐缓冲液 (PBS): 称取氯化钠 8.0g, 氯化钾 0.20g, 磷酸氢二钠 1.44g, 磷酸二氢钾 0.24g, 加水溶解并稀释至 1000ml, 经 121℃、15 分钟灭菌, 或用商品化的 PBS 溶液。

2.1.5 0.25%乙二胺四乙酸二钠 (EDTA) -胰酶: 商品化 0.25%EDTA-胰酶。

2.1.6 显色液: 取商品化细胞计数试剂盒 (CCK-8) 溶液 540μl, 加维持培养液 810μl。

2.2 仪器 酶标仪、倒置显微镜、细胞计数仪。

3 操作方法

3.1 样品制备 无菌条件下, 用维持培养液将尼妥珠单抗标准品或供试品同比稀释至约 300μg/ml (若供试品溶液蛋白浓度高于 5.5mg/ml 时, 以制剂缓冲液预稀释至标准品蛋白浓度), 用维持培养液做 4 倍倍比稀释, 共 8 个稀释度, 每个稀释度做两个复孔。

3.2 测定方法 H292 细胞用完全培养液于 37℃, 5%二氧化碳条件下培养, 控制细胞浓度为每 1ml 含 $1.0 \times 10^5 \sim 5.0 \times 10^5$ 个细胞。弃去培养瓶中的培养液, 0.25% EDTA-胰酶消化并收集细胞, 用完全培养液配成每 1ml 含有 $6 \times 10^4 \sim 8 \times 10^4$ 个细胞的细胞悬液, 接种于 96 孔细胞培养板中, 每孔 100μl, 于 37℃、5%二氧化碳条件下培养。18~20 小时后弃去细胞培养板中的完全培养液, 再加入不同浓度标准品或供试品溶液, 每孔 200μl, 于 37℃、5%二氧化碳条件下培养 68~72 小时。每孔加入显色液 30μl, 混匀, 于 37℃ 5%二氧化碳条件下培养 4 小时后, 放入酶标仪, 以 630nm 作为参比波长, 在波长 450nm 处测定吸光度, 记录实验结果。以细胞孔中加入 200μl 维持培养液作为细胞对照, 无细胞孔内加入 200μl 维持培养液作为空白对照, 同法测定, 记录实验结果。

3.3 数据分析 采用计算机程序或四参数回归算法进行处理, 以标准品或供试品对数浓度为横坐标, 以吸光度值为纵坐标, 使用限制模式 (最大值、最小值、斜率一致) 统计计算样品和标准品的半效浓度 (ED_{50}), 按下式计算结果:

$$\text{供试品生物学活性} = \text{标准品 } ED_{50} \div \text{供试品 } ED_{50} \times 100\%$$

4 结果判定

4.1 系统适用性要求 S 形曲线平行假设未被否决 (P 值 > 0.05); ED_{50} 比值的 95%置信范围不超过 0.4~1.6。

4.2 合格标准: 供试品生物学活性应为标准品的 50%~200%。

5 注意事项

5.1 尼妥珠单抗稀释过程应在无菌条件下操作, 且倍比稀释应准确。

5.2 确保 H292 细胞状态良好, 均匀接种于 96 孔细胞培养板。

起草人: 李萌

复核人: 王兰

重组人促红素

简 述

重组人促红素 (Recombinant human erythropoitin, rhEPO) 是利用基因重组技术, 在哺乳类细胞如 CHO 中高效表达的一种高度糖基化的活性蛋白类药物。rhEPO 中有 4 个半胱氨酸形成的两条二硫键, 含有 3 个 N-连接糖基化位点和 1 个 O-连接的糖基化位点。糖基化尤其是糖链末端唾液酸化对稳定 rhEPO 的体内活性具有重要作用。重组人促红素可促进红系祖细胞的增殖、分化和红细胞的成熟, 现行版《中国药典》三部收录重组人促红素品种, 剂型包括注射液和注射用冻干粉两种, 现阶段的临床应用主要用于治疗慢性肾病引起的贫血和组织缺氧症状。

重组人促红素作为人用重组 DNA 蛋白制品, 需全程质量控制, 其质控体系主要包括原、辅料质量控制, 生产工艺和过程控制及制品检定等。按现行标准重组人促红素的原液、半成品及成品的质控项目总计 30 余项, 其中原液的检验项目主要包括蛋白质含量、体内生物学活性、体外生物学活性、体内比活性、纯度、分子量、紫外光谱、等电聚焦、唾液酸含量、外源性 DNA 残留量、CHO 细胞蛋白质残留量、细菌内毒素检查、牛血清白蛋白残留量、肽图、N 端氨基酸序列。半成品的检验项目主要包括细菌内毒素检查、无菌检查。成品的检验项目主要包括鉴别试验、外观、可见异物、装量、水分、pH 值、人血白蛋白含量、渗透压摩尔浓度、体外生物学活性、体内生物学活性、无菌检查、细菌内毒素检查、异常毒性等。依据生产工艺的不同, 对于一些其他辅料例如聚山梨酯 80、盐酸组氨酸等也需要进行检测并控制其添加量。

体外生物学活性测定法

1 原理

采用酶联免疫法 (ELISA), ELISA 是以免疫学反应为基础, 将抗原、抗体的特异性反应与酶对底物的高效催化作用相结合起来的一种敏感性很高的试验技术。将重组人促红素抗体固相化及酶标记。结合在固相载体表面的重组人促红素抗体仍保持其免疫学活性。酶标记的重组人促红素抗原或抗体既保留其免疫学活性, 又保留酶的活性。受检重组人促红素样本与固相载体表面的重组人促红素抗体起反应, 通过反应也结合在固相载体上。再加入酶标记的重组人促红素抗原或抗体。加入酶反应的底物后, 底物被酶催化成为有色产物, 产物的量与样品中重组人促红素的量直接相关, 根据呈色的深浅进行定性和定量分析。

2 材料和设备

2.1 材料

2.1.1 标准品 采用试剂盒自带的促红细胞生成素标准品。

2.1.2 ELISA 试剂盒。

2.2 设备 多功能酶标仪。

3 操作方法

3.1 供试品预稀释：用试剂盒提供的稀释液将供试品稀释至蛋白含量约 40IU/ml。

3.2 将标准品溶液和供试品溶液各 100 μ l 加入酶标板，室温 2 小时洗板 4 次。

3.3 加试剂盒提供的抗重组人促红素抗体 200 μ l/孔，室温反应 2 小时后，清空酶标板中液体。

3.4 用试剂盒提供的清洗液清洗酶标板，洗板 4 次。

3.5 加试剂盒提供的显色底物溶液 200 μ l/孔，室温反应 30 分钟。

3.6 打开多功能酶标仪电源，打开控制电脑，等待仪器自检通过后，设置样品模板排列，设置检测参数和检测方法。

3.7 在酶标板中加入试剂盒提供的终止液 100 μ l/孔，放入酶标仪，以波长 450/600nm 测定吸光度。

4 结果计算

$$\text{供试品活性 (IU/支)} = \text{测定结果} \times \text{稀释倍数} \times \text{标示装量} \div 1000$$

5 结果判定

标准品拟合线性 R^2 应不低于 0.98，活性检验结果应符合标示量的 80%~120%。

6 注意事项

样品的多倍稀释操作需仔细，试剂盒试剂在使用前应放置至温度达到室温。

起草人：李响 秦玺

复核人：饶春明 周勇

体内生物学活性测定法

1 原理

重组人促红素可刺激网织红细胞生成，给小鼠皮下注射重组人促红素后，其网织红细胞数量随重组人促红素注射剂量的增加而升高。网织红细胞是一种不成熟的红细胞，含有 DNA 成分，可以被 DNA 荧光染料染色标记。采用流式细胞技术，测定红细胞及网织红细胞数量，利用网织红细胞数对红细胞数的比值变化，通过剂量反应平行线法检测重组人促红素体内生物学活性。

2 材料和设备

2.1 材料

2.1.1 标准品：重组人促红素活性测定用标准品（630IU/支）。

2.1.2 乙二胺四乙酸二钾。

2.1.3 牛血清白蛋白。

2.1.4 0.9%氯化钠溶液。

2.2 设备 网织红细胞自动分析仪。

2.3 溶液制备

2.3.1 乙二胺四乙酸二钾抗凝剂：称取乙二胺四乙酸二钾 100mg，加生理氯化钠溶液 10ml 溶解，混匀，使用时新鲜配制。

2.3.2 稀释液：称取 0.1g 牛血清白蛋白 100mg，加生理氯化钠溶液溶解定容至 100ml，混匀，使用时新鲜配制。

3 操作方法

3.1 标准品溶液制备 取 1 支重组人促红素活性测定用标准品按说明书复溶，用稀释液稀释成高、中、低三个剂量重组人促红素标准品溶液。

3.2 供试品溶液的制备 将供试品用稀释液稀释成高中低 3 个剂量与重组人促红素标准品溶液单位相近的供试品溶液。

3.3 注射与采血 按低中高 3 个剂量组，分别给近交系 6~8 周龄小鼠（雌性 BALB/C 小鼠）或 B6D2F1 小鼠皮下注射重组人促红素标准品及供试品溶液，每组至少 4 只，每鼠注射量不大于 0.5ml。在注射后的第 4 天从小鼠眼眶采血 3~4 滴，置于预先加入 200 μ l 乙二胺四乙酸二钾抗凝剂的采血管中，待测定。

打开网织红细胞分析仪电源，调节压力稳定，检查液路，待仪器自检完成后，先运行一次自动清洗程序，然后取抗凝血，用网织红细胞分析仪计数每只小鼠血液中的网织红细胞数对红细胞总数的比值（Ret%），检测完毕后，按关机程序清洗关机。

4 结果计算

按注射剂量（IU）对 Ret% 的量反应平行线测定法（现行版《中国药典》三部通则 1431）计算供试品体内生物学活性。

5 结果判定

数据需满足方差分析

变异来源	F 规定值	P 规定值
二次曲线	<4.96	>0.05
反向二次曲线	<4.96	>0.05
偏离平行	<4.96	>0.05
回归	>4.96	<0.05
剂量间	>3.33	<0.05

活性检验结果应符合标示量的 80%~140%。

6 注意事项

注射样品时注意小心操作，避免漏液。

起草人：李响 秦玺
复核人：饶春明 周勇

唾液酸含量测定法

1 原理

用酸水解方法将重组人促红素中结合状态的唾液酸变成游离状态，游离状态的唾液酸与间苯二酚反应生成有色化合物，该化合物具有特定的吸收峰，吸收值与唾液酸量成正相关。再用有机相萃取后，通过分光光度计测定吸光度值，通过唾液酸标准做量效曲线，计算重组人促红素中唾液酸的含量。

2 材料和设备

2.1 材料 唾液酸对照品、间苯二酚、硫酸铜、盐酸、正丁醇、乙酸丁酯。

2.2 设备 紫外分光光度计。

2.3 溶液制备

2.3.1 唾液酸储备液 (1mg/ml): 精密称取 10.5mg 唾液酸对照品，置 10ml 量瓶中，用超纯水溶解至刻度，按一次使用量分装， -70°C 贮存有效期 1 年。 4°C 保存使用期为 2 周，仅可冻融 1 次。

2.3.2 间苯二酚溶液 (2%): 精密称取间苯二酚 1.000g，加超纯水 40ml 溶解，稀释至 50ml，置棕色瓶中 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 保存，有效期 2 个月。

2.3.3 硫酸铜溶液 (0.1mol/L): 精密称取 1.245g 硫酸铜，超纯水溶解至 50ml，置棕色瓶中 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 保存，有效期 2 个月。

2.3.4 盐酸溶液 (25%): 量取盐酸 172ml，加超纯水稀释至 250ml，混匀，室温保存，有效期 3 个月。

2.3.5 间苯二酚-盐酸溶液: 取 2% 间苯二酚溶液 5ml，0.1mol/L 硫酸铜溶液 125 μl ，25% 盐酸溶液 40ml，加超纯水稀释至 50ml。混匀即得，实验前 4 小时内配制。

2.3.6 乙酸丁酯-正丁醇溶液: 量取乙酸丁酯溶液 50ml，正丁醇溶液 12.5ml，混匀即得，室温下 12 小时内使用。

3 操作方法

3.1 唾液酸对照品溶液 (200 $\mu\text{g/ml}$) 的制备 取唾液酸贮备液 100 μl ，加超纯水 400 μl ，混匀即得，用前配制。

3.2 供试样品的稀释 取供试品适量，加水稀释至蛋白质浓度为每 1ml 含 0.2~0.4mg，作为供试品溶液。按下表分别在已标记玻璃管中加入唾液酸对照品溶液、超纯水、供试样品 (每种做 3 个平行)，并混匀。

	唾液酸 ($\mu\text{g/ml}$)						供试品
	对照	1	2	3	4	5	
唾液酸对照品 (*L)	—	10	20	25	30	40	—
超纯水 (*L)	100	90	80	75	70	60	—
供试品 (*L)	—	—	—	—	—	—	100

3.3 酸水解及显色测定 每管加入间苯二酚-盐酸溶液 1ml, 加盖振荡混匀, 沸水浴 30 分钟(水浴面高于管内液面约 2cm), 水浴结束后置冰浴中 3 分钟, 同时振摇。再在每管中加乙酰丁酯-丁醇溶液 2ml, 充分混匀, 室温放置 10 分钟。用紫外分光光度计测定各管中上层溶液的吸光度, 检测波长 580nm。

4 结果计算

用唾液酸对照品溶液的浓度对其相应的吸光度(A)做直线回归(相关系数应不低于 0.99), 并根据标准曲线计算 5 μ g 唾液酸的吸光度值, 再按下式计算供试品唾液酸含量。

$$\text{唾液酸含量 (mol/mol蛋白质)} = \frac{A_2 \times 5 \times 3.24 \times W \times n}{A_1 \times P \times 100}$$

式中, A_1 为 5 μ g 唾液酸的吸光度; A_2 为供试品的吸光度; n 为供试品稀释倍数; P 为供试品蛋白质含量, μ g/ μ l; W 为 1nmol 促红素的量, 相当于 30.6 μ g。

5 结果判定

每 1mol 重组人促红素样品中唾液酸含量应不低于 10mmol。

6 注意事项

处理样品时需要用到易挥发的有机溶剂, 注意及时通风防护, 样品在沸水浴时, 玻璃试管不要盖的过紧, 以防试管内气体受热膨胀发生危险。

起草人: 李响 陶磊

复核人: 饶春明 周勇

蛋白质含量测定法

1 原理

由于蛋白质中存在着含有共轭双键的酪氨酸和色氨酸, 它们具有吸收紫外光的性质, 其吸收高峰在 280nm 波长处, 且在此波长内吸收峰的光密度值 OD_{280nm} 与其浓度服从朗伯比尔定律成正比关系, 故可用于蛋白质定量。

2 材料和设备

2.1 材料 碳酸氢铵。

2.2 设备 紫外分光光度计。

2.3 溶液配制 稀释液: 碳酸氢铵溶液 (4g/L), 准确称取 0.4g 碳酸氢铵溶入超纯水中, 定容至 100ml。4 $^{\circ}$ C 保存使用期为 1 个月。

3 操作方法

3.1 供试品的稀释 将供试品用稀释液稀释至 0.5~2mg/ml, 作为供试品溶液。

3.2 波长扫描测定方法 用光径 1.0cm 的石英杯, 以稀释液为空白对照, 测定供试品溶液在 320nm、325nm、330nm、335nm、340nm、345nm、350nm 的吸光度。在开始波长 276nm,

终止波长 280nm, 测定供试品溶液最大吸光度 A_{\max} 。

4 结果计算

用测得的吸光度的对数与其对应的波长的对数作直线回归, 求得回归方程。将 A_{\max} 对应的波长代入回归方程求得供试品溶液由于光散射产生吸光度 $A_{\text{光散射}}$ 。按下式计算供试品蛋白质含量:

$$\text{蛋白质含量 (mg/ml)} = (A_{\max} - A_{\text{光散射}}) \times \text{供试品稀释倍数} \times 10/7.43$$

5 结果判定

重组人促红素原液蛋白质含量应不低于 0.5mg/ml。

6 注意事项

注意石英杯洁净, 供试品溶液的吸光度读数, 以在 0.3~0.7 为宜。

起草人: 李响 范文红

复核人: 饶春明 周勇

等电点测定法

1 原理

在电泳介质中加入两性电解质载体, 在直流电场中, 两性电解质载体即形成一个由正极到负极逐步增加的 pH 梯度, 正极附近是低 pH 区, 负极附近是高 pH 区。在此体系中, 蛋白质分子在不同 pH 下的解离状态不同, 带上不同性质和数量的电荷, 在电场力作用下向着一定方向移动, 当移动到其等电点位置上, 蛋白质分子呈电中性, 不再迁移。即被聚焦于一个狭窄的区带中, 这种电泳技术称为等电聚焦电泳。该方法常用于蛋白质, 多肽等的等电点测定及电荷异质性评价。

2 材料和设备

2.1 材料 尿素、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、过硫酸铵、三氯醋酸、磺基水杨酸、乙醇、冰醋酸、考马氏亮蓝 G250 (或 R250)、甘油、磷酸、氢氧化钠、两性电解质溶液 (pH 3~10, 浓度 40%)、两性电解质溶液 (pH 3~5, 浓度 40%)、甲基红、等电聚焦标准蛋白。

2.2 设备 电泳槽、电泳仪、摇床、凝胶扫描分析仪。

2.3 溶液制备

2.3.1 A 液: 称取丙烯酰胺 29.1g, 甲叉双丙烯酰胺 0.9g, 加适量水溶解, 并稀释至 100ml, 双层滤纸滤过, 避光保存。

2.3.2 B 液 (10%过硫酸铵): 称取 100mg 过硫酸铵 (AP), 加水溶解至 1ml, 临用新制。

2.3.3 固定液: 称取三氯醋酸 34.5g、磺基水杨酸 10.4g, 加水溶解并稀释至 300ml。置于棕色玻璃瓶中, 室温保存。

2.3.4 脱色液 (平衡液): 量取 95%乙醇 500ml、冰醋酸 160ml, 加水稀释至 2000ml。置

于玻璃瓶中，室温保存。

2.3.5 染色液：称取考马氏亮蓝 G250（或 R250）0.35g，加脱色液 300ml，在 60~70℃ 水浴中加热，使溶解。置于棕色玻璃瓶中，室温保存。

2.3.6 保存液：量取甘油 30ml，加脱色液 300ml，混匀。置于玻璃瓶中，室温保存。

2.3.7 正极液（0.5mol/L 磷酸溶液）：量取磷酸 50ml，加水至 1800ml。置于棕色玻璃瓶中，4℃ 保存。

2.3.8 负极液（0.2mol/L 氢氧化钠溶液）：称取氢氧化钠 8g，加水溶解并稀释至 1000ml。置于棕色玻璃瓶中，4℃ 保存。

2.3.9 预电泳缓冲液：两性电解质溶液（pH 3~10，浓度 40%）2ml，甘油 6ml，0.1% 甲基红 2ml，混匀分装在小离心管中，4℃ 保存。

2.3.10 供试品缓冲液（4 倍浓度）取甘油 8ml、40% 两性电解质（pH 3~10）溶液 4ml，加水至 20ml。加 0.1% 甲基红溶液 20 μ l。

3 操作方法

3.1 安装好电泳仪，调试正常。

3.2 取尿素 9g、A 液 6.0ml，40% pH 3~5 两性电解质 1.05ml、40% pH 3~10 两性电解质 0.45ml、水 13.5ml，抽气 5~10 分钟，加 B 液 300 μ l，N, N, N', N'-四甲基乙二胺 15 μ l，混匀后缓慢地注入水平模具内，室温下聚合。

3.3 将已聚合的聚丙烯酰胺凝胶放在冷却板上，其间涂以液体石蜡或煤油并避免产生气泡。

3.4 用正极液与负极液分别润湿正极与负极电极条，然后分别放于阳极与阴极上，将加样滤纸放在凝胶上。

3.5 将供试品对水透析（或用其他方法）脱盐，并使蛋白质含量调节至每 1ml 含 0.5mg 以上（如供试品蛋白浓度太低，则需采用适当方法浓缩），对等电聚焦标准蛋白做相同处理。

3.6 加预电泳缓冲液 20 μ l 在 10℃，200V（~10mA）条件下进行预电泳 30 分钟。

3.7 加供试品溶液 5~30 μ l。将电极对准电极条的中心，加盖，在上限电压 2000V、上限电流 50mA、功率为 1cm 胶 1W、温度 4℃ 的电泳条件下，开始电泳，电泳 2.5 小时，同时做等电聚焦标准蛋白。（在电泳 30 分钟后去掉加样滤纸）

3.8 固定：电泳结束后取下电泳后的凝胶，置于固定液中，用摇床摇动浸泡 20 分钟以上。

3.9 平衡：取出固定后的凝胶，置于平衡液中，用摇床摇动浸泡 20~30 分钟。

3.10 染色：取出平衡后的凝胶，置于染色液中，用摇床摇动染色 40~60 分钟。

3.11 脱色：取出染色后的凝胶，置于脱色液中，用摇床摇动洗脱，不断更换新鲜的脱色液，直至凝胶底色背景近于无色为止。

3.12 保存：取出脱色后的凝胶放入保存液中 30 分钟，凉干。亦可做成干胶永久保存。

4 结果计算

凝胶完成显色处理后，对其进行拍照或扫描，通常采用商品化的带有数据分析软件的凝胶扫描系统。

供试品主成分迁移距离应与对照品一致，以各标准品的等电点（pI）对其相应的迁移距离作线性回归，所得标准线性方程应 $R^2 \geq 0.95$ 。

5 结果判定

供试品电泳图谱应与对照品一致。

6 注意事项

等电聚焦期间产生大量热量，应采取必要的冷却装置，并将凝胶冷却温度设置至 4℃。

起草人：李响 秦玺

复核人：饶春明 周勇

干扰素

简 述

干扰素（IFN）是机体免疫细胞受干扰素诱生剂作用后产生的一类细胞因子，它们结构类似、功能接近，具有干扰病毒繁殖、抑制肿瘤细胞生长和免疫调节等功能。干扰素根据受体、结构、来源的不同，分为 I、II、III 三型。I 型干扰素包括 α 、 β 、 ϵ 、 τ 、 ω 、 κ 等亚型，II 型干扰素目前只发现一种，即 IFN- γ ，III 型干扰素目前只发现一种，即 IFN- λ 。已经收录进 2015 年版《中国药典》三部的重组人干扰素品种有 19 个，型别包括：rhIFN α 1b、rhIFN α 2a、rhIFN α 2b、rhIFN γ ，剂型包括注射液、注射用无菌粉末、滴眼液、栓剂、软膏剂、凝胶剂、喷雾剂等，批准的适应症包括毛细胞白血病、肾癌、黑色素瘤、Kaposi 肉瘤、慢性粒细胞性白血病和中低度恶性非霍奇金淋巴瘤，急、慢性丙型病毒性肝炎，慢性活动性乙型肝炎，宫颈糜烂，类风湿性关节炎，肝纤维化，异位性皮炎等。

重组人干扰素制品应依据现行版《中国药典》或其他经批准的国家药品标准进行检定，并应符合相关要求。重组人干扰素的检定内容按照生产阶段分为原液、半成品和成品检定。原液检定主要包括生物学活性、蛋白质含量、比活性、纯度、分子量、外源性 DNA 残留量、宿主菌蛋白质残留量、残余抗生素活性、细菌内毒素检查、等电点、紫外光谱、肽图、N 端氨基酸序列等；半成品检定主要包括无菌检查、细菌内毒素检查等；成品检定主要包括鉴别试验、外观、可见异物、装量、水分、渗透压摩尔浓度、生物学活性、残余抗生素活性、无菌检查、细菌内毒素检查、异常毒性等。依据生产工艺的不同，对于一些其他辅料例如对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、聚山梨酯 80 等也需要进行检测并控制其添加范围。

生物学活性测定法（一）——细胞病变抑制法

1 原理

生物学活性测定是评价干扰素有效性的重要指标。本法系依据干扰素可以保护人羊膜细胞（WISH）免受水泡性口炎病毒（VSV）破坏的作用，用结晶紫对存活的 WISH 细胞染色，于波长 570nm 处测定其吸光度，可得到干扰素对 WISH 细胞的保护效应曲线，以此测定干扰素生物学活性。

2 材料和设备

2.1 材料

2.1.1 MEM/RPMI 1640 培养液：加青霉素至 10^5 IU/L 和链霉素至 10^3 IU/L，标示有效期，4℃ 条件下保存。

2.1.2 完全培养液：量取新生牛血清 100ml，加入 2.1.1 培养液 900ml，混匀，置于玻璃或塑料瓶中，标示有效期，4℃ 保存。

2.1.3 测定培养液：量取新生牛血清 70ml，加入 2.1.1 培养液 930ml，混匀，置于玻璃或塑料瓶中，标示有效期，4℃ 保存。

2.1.4 攻毒培养液：量取新生牛血清 30ml，加入 2.1.1 培养液 970ml，混匀，置于玻璃或塑料瓶中，标示有效期，4℃ 保存。

2.1.5 消化液：称取乙二胺四乙酸二钠 0.2g、氯化钠 8.0g、氯化钾 0.2g、磷酸氢二钠 1.152g、磷酸二氢钾 0.2g，加水溶解并稀释至 1000ml，经 121℃ 15 分钟灭菌。标示有效期，常温下保存。

2.1.6 染色液：称取结晶紫 50mg，加无水乙醇 20ml 溶解后加水稀释至 100ml。标示有效期，常温下保存。

2.1.7 脱色液：量取无水乙醇 50ml，乙酸 0.1ml，用水稀释至 100ml。标示有效期，常温下保存。

2.1.8 PBS 缓冲液：称取氯化钠 8.0g、氯化钾 0.20g、磷酸氢二钠 1.44g、磷酸二氢钾 0.24g，加水溶解并稀释至 1000ml，经 121℃ 15 分钟灭菌。置于玻璃或塑料瓶中，标示有效期，常温保存。

2.1.9 WISH 细胞（人羊膜细胞）：使 WISH 细胞在培养基中贴壁生长。按（1:2）~（1:4）传代，每周 2~3 次，于完全培养液中生长。

2.1.10 VSV 病毒（水泡性口炎病毒）：-70℃ 保存。

2.1.11 标准品：重组人干扰素活性测定国家标准品。

2.2 设备 净化工作台、倒置显微镜、二氧化碳培养箱、普通冰箱、低温冰箱、液氮罐、取液器、普通离心机、多功能酶标仪。

3 操作方法

3.1 铺板 取培养的细胞弃去培养液，用 PBS 洗 2 次后消化和收集细胞，用完全培养液配制每 1ml 约含 3.0×10^5 个细胞的细胞悬液，接种于 96 孔细胞培养板中，每孔 100 μ l。于 37℃、5%二氧化碳条件下培养约 5 小时。

3.2 标准品溶液的制备 取干扰素生物学活性测定标准品用 1ml 测定培养液复溶，用测定

培养液进行预稀释,使终浓度为每 1ml 约含 1000IU。

3.3 供试品溶液的制备 取供试品,用测定培养液进行预稀释,使终浓度为每 1ml 约含 1000IU。

3.4 制备样本梯度 于 96 孔细胞培养板中每孔加入 150 μ l 测定培养液。在 A6、A7 各孔中每孔加入 50 μ l 标准样本溶液,在 A2、A3; A4、A5; A8、A9; A10、A11 各孔中每孔加入 50 μ l 各供试品溶液。自 A 行取 50 μ l 至 B 行作 4 倍稀释,同理由 B 行至 C 行作 4 倍稀释,依次往下,共 8 个稀释度,每个稀释度做 2 个孔,每孔留 150 μ l 余液。

3.5 加样 取出 3.1 制备的细胞培养板,将 3.4 制备的样本梯度移入该细胞培养板,每孔 100 μ l。于 37 $^{\circ}$ C, 5%二氧化碳条件下培养约 20 小时。

3.6 制备病毒液 将保存的 VSV 病毒用攻毒培养液稀释至约 100TCID₅₀。

3.7 攻毒 取 3.5 制备的细胞培养板,弃去上清。加入病毒液,每孔 100 μ l。于 37 $^{\circ}$ C、5%二氧化碳培养约 20 小时(镜检标准品溶液的 50%病变点约在 1IU/ml)。

3.8 染色 弃去细胞培养板中的上清液,每孔加入 50 μ l 染色液,室温放置 30 分钟。

3.9 脱色 弃去培养板染色液,流水小心冲洗,吸干残留水分。每孔加入 100 μ l 脱色液,室温放置 5 分钟,混匀。

3.10 比色 以 630nm 为参比波长,于波长 570nm 处用酶标仪测定吸光度,记录测定结果。

4 结果计算

试验数据采用计算机程序或四参数回归算法进行处理。并按下式计算试验结果供试品生物学活性

$$\text{供试品生物学活性 (IU/ml)} = (P_r \times D_s \times E_s) / (D_r \times E_r)$$

式中 P_r 为标准品生物学活性, IU/ml; D_s 为供试品预稀释倍数; D_r 为标准品预稀释倍数; E_s 为供试品相当于标准品半效量的稀释倍数; E_r 为标准品半效稀释倍数。

5 结果判定

成品生物学活性应为标示量的 80%~150%。

6 注意事项

VSV 的操作应在 P2 实验室进行。

起草人: 裴德宁 郭莹

复核人: 饶春明 周勇

生物学活性测定(二)——报告基因法

1 原理

生物学活性测定是评价干扰素有效性的重要指标。将含有干扰素反应元件和荧光素酶基因的质粒转染到 HEK293 细胞中,构建细胞系 HEK293puroISRE-Luc,作为活性测定细胞,当 I 型干扰素与测活细胞膜上的干扰素受体结合后,通过信号传导,激活 ISRE,启动下游荧光素酶

的表达,表达量与干扰素的活性浓度成正相关,加入荧光素酶底物后进行化学发光检测,可以得到干扰素对化学发光强度的剂量反应曲线,以此测定干扰素生物学活性。

2 材料和设备

2.1 材料

2.1.1 完全培养液: MEM 培养液,含有 2mmol/L 的 L-谷氨酰胺, 1mmol/L 的丙酮酸钠, 0.01mg/L 的非必需氨基酸, 2 μ g/ml 的嘌呤霉素, 100U/ml 的青霉素, 100 μ g/ml 的链霉素, 10% 的胎牛血清。4 $^{\circ}$ C 保存。

2.1.2 测定培养液: 除不含嘌呤霉素外, 其他成分与完全培养液相同。4 $^{\circ}$ C 保存。

2.1.3 PBS: 取氯化钠 8.0g、氯化钾 0.20g、磷酸氢二钠 1.44g、磷酸二氢钾 0.24g, 加水溶解并稀释至 1000ml, 经 121 $^{\circ}$ C、15 分钟灭菌。

2.1.4 消化液: 称取乙二醇四乙酸二钠 0.2g、胰酶 2.5g, 用 PBS 溶解并稀释至 1000ml, 除菌过滤。4 $^{\circ}$ C 保存。

2.1.5 荧光素酶报告基因检测试剂盒: 包括细胞裂解液、荧光素酶底物等。

2.1.6 重组人干扰素活性测定国家标准品。

2.2 设备 净化工作台、倒置显微镜、二氧化碳培养箱、普通冰箱、低温冰箱、液氮罐、取液器、普通离心机、多功能酶标仪。

3 操作方法

3.1 标准品溶液的制备 取干扰素生物学活性测定标准品用 1ml 测定培养液复溶, 用测定培养液进行预稀释, 终浓度为每 1ml 约含 10000IU。

3.2 供试品溶液的制备 取供试品, 用测定培养液进行预稀释, 终浓度为每 1ml 约含 10000IU。

3.3 制备样本梯度 于 96 孔细胞培养板中每孔加入 150 μ l 测定培养液。在 A6、A7 各孔中每孔加入 50 μ l 标准样本溶液, 在 A2、A3; A4、A5; A8、A9; A10、A11 各孔中每孔加入 50 μ l 各供试品溶液。自 A 行取 50 μ l 至 B 行作 4 倍稀释, 同理由 B 行至 C 行作 4 倍稀释, 依次往下, 共 8 个稀释度, 每个稀释度做 2 个孔, 每孔留 100 μ l 余液。

3.4 接种细胞 使 HEK293puroISRE-Luc 细胞在完全培养液中贴壁生长, 按 1:4 传代, 每周 2~3 次, 于完全培养液中生长。取培养的细胞弃去培养液, 用 PBS 洗 1 次后消化和收集细胞, 用测定培养液配制成每 1ml 含 $3.5 \times 10^5 \sim 4.5 \times 10^5$ 个细胞的细胞悬液。将上述细胞悬液接种于 3.3 制备的 96 孔细胞培养板中, 每孔 100 μ l。于 37 $^{\circ}$ C、5%二氧化碳条件下培养 18~24 小时。

3.5 小心吸净 96 孔细胞培养板中的上清液, 按荧光素酶报告基因检测试剂盒说明书加入细胞裂解液和荧光素酶底物, 用化学发光酶标仪进行测定, 记录测定结果。

4 结果计算

试验数据采用计算机程序或四参数回归计算法进行处理。并按下式计算试验结果

$$\text{供试品生物学活性 (IU/ml)} = (P_r \times D_s \times E_s) / (D_r \times E_r)$$

式中 P_r 为标准品生物学活性, IU/ml; D_s 为供试品预稀释倍数; D_r 为标准品预稀释倍数; E_s

为供试品相当于标准品半效量的稀释倍数； E_s 为标准品半效稀释倍数。

5 结果判定

生物学活性应为标示量的 80%~150%。

6 注意事项

本方法仅用于测定 I 型干扰素的生物学活性。

起草人：裴德宁 郭莹

复核人：饶春明 周勇

对羟基苯甲酸甲酯及对羟基苯甲酸丙酯残留量测定法

1 原理

将分析样品在进样口中气化后，由载气带入色谱柱，通过对待检测混合物中组分有不同保留性能的色谱柱，使各组分分离，依次导入检测器，以得到各组分的检测信号。按照导入检测器的先后次序，经过对比，可以区别出是什么组分，根据峰高度或峰面积可以计算出各组分含量。

2 材料和设备

2.1 材料 对羟基苯甲酸甲酯（分析纯），对羟基苯甲酸丙酯（分析纯），对苯二酚（分析纯），无水乙醇（分析纯）。

2.2 设备 气相色谱仪、氢离子化火焰检测器、涂布 100%—聚二甲基硅氧烷石英毛细管柱。

3 操作方法

3.1 色谱条件与系统适用性试验 用涂布 100%—聚二甲基硅氧烷石英毛细管柱，柱温 180℃，气化室温度 250℃，氢离子化火焰检测器，检测器温度 300℃。载气为氮气，流速 2ml/min。进样方式采用分流进样，进样量为 1μl。内标物与对羟基苯甲酸甲酯及对羟基苯甲酸丙酯之间的分离度均应大于 1.5，对羟基苯甲酸甲酯及对羟基苯甲酸丙酯的标准对照品溶液连续进样 5 次，所得对羟基苯甲酸甲酯峰及对羟基苯甲酸丙酯峰与对苯二酚峰面积之比的相对标准偏差应不大于 5%。

3.2 内标物质溶液的制备 精密称取对苯二酚 0.1g，用无水乙醇定容至 100ml 制成每 1ml 中含有 1mg 的内标物质溶液。

3.3 对照品溶液的配制 精密称取对羟基苯甲酸甲酯 1.0g、对羟基苯甲酸丙酯 0.1g，用无水乙醇稀释并定容至 100ml，该溶液浓度为对羟基苯甲酸甲酯约 1.00%，对羟基苯甲酸丙酯约 0.10%。

3.4 校正因子测定用对照溶液的配制 取对照品溶液 60μl，内标物质溶液 100μl，加纯化水 840μl，即得含内标物质 100μg/ml，对羟基苯甲酸甲酯 0.06%，对羟基苯甲酸丙酯 0.006% 的校正因子测定用对照溶液。

3.5 测定法 取供试品 840 μ l, 加入内标物质溶液 100 μ l, 无水乙醇 60 μ l 混匀, 取 1 μ l 注入气相色谱仪, 另取 1 μ l 校正因子测定用对照溶液, 同法操作。

4 结果计算

按内标加校正因子测定法计算对羟基苯甲酸甲酯及对羟基苯甲酸丙酯含量。

5 结果判定

对羟基苯甲酸甲酯含量应为 0.04%~0.10%, 对羟基苯甲酸丙酯含量应为 0.004%~0.010%。

6 注意事项

内标物质溶液及对照品溶液应在测定当天配制。

起草人: 裴德宁 郭莹

复核人: 饶春明 周勇

重组人白介素-2

简述

白介素-2 (Interleukin-2, IL-2) 是辅助型 T 淋巴细胞 (TH) 活化产生的细胞因子。IL-2 具有双重调控免疫应变的能力, 可有效诱导细胞免疫和体液免疫应答。重组人白介素-2 (rhIL-2) 是基因重组产品, 系由高效表达人 IL-2 的大肠埃希菌, 经发酵、分离和高度纯化后获得的一种非糖基化蛋白, 生物活性与天然 IL-2 相同, 含有 133 个氨基酸残基, 相对分子质量为 15.5kDa。rhIL-2 分子含有 3 个半胱氨酸, 分别位于第 58、105 和 125 位, 其中 58 位与 105 位半胱氨酸之间所形成的链内二硫键对于保持 rhIL-2 生物学活性起重要作用。已经收录进现行版《中国药典》三部的重组人白介素-2 品种剂型包括注射液和注射用无菌粉末两种。rhIL-2 的适应症包括: ①用于肾细胞癌、黑色素瘤、乳腺癌、膀胱癌、肝癌、直肠癌、肺癌的治疗。用于癌性胸腹水的控制, 也可以用于淋巴因子激活的杀伤细胞的培养。②用于手术、放疗及化疗后的肿瘤患者的治疗, 可增强机体免疫功能。③用于先天或后天免疫缺陷症的治疗, 提高病人细胞免疫功能和抗感染能力。④各种自身免疫病的治疗, 如类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、干燥综合征等。⑤对某些病毒性、杆菌性疾病、胞内寄生菌感染性疾病, 如乙型肝炎、麻风病、肺结核、白色念珠菌感染等具有一定的治疗作用。

重组人白介素-2 应依据现行版《中国药典》或其他国家药品标准进行检定, 并应符合相关要求。重组人白介素-2 的检定内容按照生产阶段分为原液、半成品和成品检定。原液检定

主要包括生物学活性、蛋白质含量、比活性、纯度、分子量、外源性 DNA 残留量、宿主菌蛋白质残留量、残余抗生素活性、细菌内毒素检查、等电点、紫外光谱、肽图、N 端氨基酸序列等；半成品检定主要包括无菌检查、细菌内毒素检查等；成品检定主要包括鉴别试验、外观、可见异物、装量、水分、渗透压摩尔浓度、生物学活性、残余抗生素活性、无菌检查、细菌内毒素检查、异常毒性试验、残余乙腈含量等。

生物学活性测定法

1 原理

IL-2 生物学活性检测方法是根据其 T 细胞增殖因子活性，世界范围内采用 CTLL-2 细胞最为广泛。CTLL-2 为 IL-2 依赖细胞株，其生长状况因 IL-2 生物学活性的不同而不同，再利用活细胞的中线粒体可将噻唑蓝 (MTT) 定量地被还原为甲臞 (MTT Formazan)，进而通过比色法测定 MTT Formazan 的量可以直接表示 CTLL-2 细胞的生长速度。通过比较标准品 rh CTLL-2 和待测 rh CTLL-2 的半效稀释度，将标准品 rh CTLL-2 效价折算为待测 rh CTLL-2 效价。

2 材料和设备

所用试剂均需分析纯或与指定产品相当。

2.1 材料

2.1.1 RPMI 1640 培养液：取 RPMI 1640 培养基粉末 1 袋（规格为 1L），加水溶解并稀释至 1000ml，加青霉素 10^5 IU 和链霉素 10^5 IU，再加碳酸氢钠 2.1g，溶解后，混匀，除菌过滤，置玻璃瓶或塑料瓶中，4℃ 保存。（或按说明书配制）使用期限不得超过产品标示的有效期。

2.1.2 基础培养液：量取新生牛血清（FBS）10ml，加 RPMI1640 培养液 90ml。4℃ 保存。

2.1.3 完全培养液：量取基础培养液 100ml，加重组人白介素-2 至终浓度每 1ml 400IU~800IU。4℃ 保存。

2.1.4 PBS 缓冲液：称取氯化钠 8.0g、氯化钾 0.20g、磷酸氢二钠 1.44g、磷酸二氢钾 0.24g，加水溶解并稀释至 1000ml，经 121℃ 15 分钟灭菌。置于玻璃瓶或塑料瓶中，室温保存。使用期限不得超过 12 个月。

2.1.5 MTT 溶液：Fluka 88415，称取 MTT 粉末 0.10g，溶于 PBS 20ml 中，配制成每 1ml 含 5mg 的溶液，经 0.22 μ m 滤膜过滤除菌。4℃ 避光保存。使用期限不得超过 6 个月。每次实验前检查，发现蓝色沉淀者应重新配制。

2.1.6 裂解液（15%十二烷基硫酸钠溶液）：称取 30g 十二烷基硫酸钠，加水溶解并稀释至 200ml。使用期限不得超过 12 个月。

2.1.7 CTLL-2 细胞培养物：应为偏酸性、略微混浊液体，用完全培养液于 37℃、5%二氧化碳条件下培养，传代后 48~60 小时用于重组人白介素-2 生物学活性测定。

2.1.8 标准品：重组人白介素-2 生物学活性测定用国家标准品。

2.2 设备 化工作台、倒置显微镜、二氧化碳培养箱、普通冰箱、低温冰箱、液氮罐、取液器、普通离心机、多功能酶标仪。

3 操作方法

3.1~3.7 各步骤应于无菌条件下进行。

第一天

3.1 实验准备 取适量 Eppendorf 管、96 孔细胞培养板等做相应标记。将实验所用溶液预温至 37℃。

3.2 制备细胞悬液 取足量 CTLL-2 细胞培养物，每分钟 2000 转离心 5 分钟，弃去上清，收集 CTLL-2 细胞。加入 10ml RPMI 1640 培养液 2000 转/分钟离心 5 分钟后弃去上清，如此洗 3 次后重悬于基础培养液配成每 1ml 含 6.0×10^5 个细胞的细胞悬液，置于 37℃、5%二氧化碳条件下备用。

3.3 标准品溶液的制备 取重组人白介素-2 生物学活性测定国家标准品复溶后，用基础培养液稀释至每 1ml 含 200IU。每步稀释不得超过 10 倍。

3.4 供试品溶液的制备 将供试品按标示量复溶后，用基础培养液稀释成每 1ml 约含 200IU，每步稀释不得超过 10 倍。

3.5 制备样本梯度 在 96 孔细胞培养板中，每孔加入 50μl 基础培养液。在 A6、A7 各孔中每孔加入 50μl 标准品溶液，在 A2、A3；A4、A5；A8、A9；A10、A11 各孔中每孔加入 50μl 各供试品溶液，自 A 行至 H 行进行 2 倍系列稀释，共 8 个稀释度，每个稀释度做 2 个孔，每孔分别留 50μl 溶液，弃去孔中多余溶液。

3.6 加入细胞悬液并培养 每孔加入细胞悬液 50μl，于 37℃、5%二氧化碳培养 18~24 小时。

第二天

3.7 加入 MTT 溶液并培养 每孔加入 MTT 溶液 20μl，于 37℃、5%二氧化碳培养 4~6 小时。

3.8 加入裂解液并保温 每孔加入裂解液 150μl，于 37℃、5%二氧化碳条件下保温 18~24 小时。

第三天

3.9 测定吸光度 混匀细胞板中的液体，放入酶标仪，以 630nm 为参比波长，于波长 570nm 处测定吸光度，记录测定结果。

4 结果计算

计算实验结果：对各实验样品的各实验点吸光度、预稀释倍数、样本梯度等数据采用计算机程序进行处理。分别计算各实验样品的半效稀释倍数，即从样本溶液至相当于标准品 50%最大效应点的稀释倍数，并按下式计算实验结果：

$$\text{供试品生物学活性 (IU/ml)} = P_r \times \frac{D_s \times E_s}{D_r \times E_r}$$

式中 P_r 为标准品生物学活性，IU/ml； D_s 为供试品预稀释倍数； D_r 为标准品预稀释倍数； E_s 为供试品相当于标准品半效量的稀释倍数； E_r 为标准品半效量的稀释倍数。

5 结果判定

供试品生物学活性应为标示量的 80%~150%。

6 注意事项

- 6.1 样品稀释过程应在无菌条件下操作,且倍比稀释应准确。
- 6.2 确保细胞状态良好,均匀接种于96孔细胞培养板。

起草人:李永红 郭莹

复核人:饶春明 周勇

残余乙腈含量测定法

1 原理

乙腈是在 rhIL-2 的生产工艺中使用的有机溶剂。在《中国药典》2015 年版通则 0861 残留溶剂测定法中,乙腈被列为第二类溶剂,应该限制使用。本法采用顶空气相色谱法对 rhIL-2 中的乙腈残留量进行限量测定,用外标法与乙腈色谱标样的峰面积进行对比计算,要求 rhIL-2 的乙腈残留量应不高于 0.0004%。

2 材料和设备

所用试剂均需分析纯或与指定产品相当。

- 2.1 气相色谱仪及色谱工作站软件,氢火焰检测器(FID)。
- 2.2 DB-624 30m×0.53mm×3μm 毛细柱。
- 2.3 顶空进样器及配套进样瓶。
- 2.4 量瓶和移液器。
- 2.5 乙腈色谱标样。

3 操作方法

3.1 标准储备液的制备 精密量取乙腈(密度:0.78g/ml),至已含有190ml超纯水的200ml量瓶中,加超纯水稀释至刻度,摇匀。再量取新配制的乙腈溶液至量瓶中,用超纯水稀释至刻度后摇匀,制成标准储备液。

3.2 标准工作液的制备 精密量取上述储备液至量瓶中,用超纯水稀释至刻度后摇匀,制成标准工作液。

3.3 色谱条件 进样口温度:150℃,柱温:45℃,检测器温度:300℃,载气流速:4.0ml/min(氮气),氢气:47ml/min,空气:400ml/min,进样方式:顶空进样,定量进样管:1.0ml,顶空平衡温度:70℃,样品阀温度:80℃,传输线温度:85℃,样品平衡时间:15.0分钟,压力平衡时间:0.2分钟,进样管充满时间:0.2分钟,进样管平衡时间:0.2分钟,进样时间0.4分钟。

3.4 进样(顶空进样) 分别精密量取标准工作液1ml,置顶空进样瓶中,压盖,制备3瓶。每支供试品用超纯水复溶,精密量取复溶后供试品1ml(供试品为液体时直接量取1ml)置顶空进样瓶中,压盖。共制备3瓶。

4 结果计算

用外标法对结果进行判定,以检测出的乙腈峰面积作为判断标准,供试品的平均峰面积应

当小于标准工作液平均峰面积。

5 结果判定

乙腈含量应不高于 0.0004%。

6 注意事项

- 6.1 标准工作液应为新鲜配制。
- 6.2 气相色谱仪应按说明书要求进行使用和维护。

起草人：李永红 郭莹

复核人：饶春明 周勇

白细胞介素-11

简 述

白细胞介素-11 (Interleukin-11, IL-11) 是一种主要由间充质来源的黏附细胞产生的细胞因子, 具有促进造血作用等生物学功能, IL-11 的分子量为 23kD~24kD, pI 为 11.7。前体是 199 肽, 其中 21 个氨基酸是信号肽, 成熟 IL-11 有 178 个氨基酸残基, 没有二硫键和糖基化位点。中性环境中 IL-11 呈高度碱性, 带 7 个正电荷。23% Leu 使 IL-11 具有强的疏水特征; 12% Pro 集中在 N 端 1/3, 可能与 IL-11 的功能有关, 但去除 N 端序列并不显著影响 IL-11 的活性。IL-11 通过与细胞表面特异性受体-配体结合链 IL-11R α 结合, 并连接到信号传导链可溶性糖蛋白 130 (gp130) 后发挥其生物学作用。已经收录进 2015 年版《中国药典》三部的重组人白介素-11 有 2 种, 剂型均为注射用无菌粉末, 表达体系为大肠埃希菌或甲醇酵母。rhIL-11 主要用于实体瘤和白血病放、化疗后血小板减少症的预防和治疗及其他原因引起的血小板减少症的治疗。

重组人白细胞介素-11 制品应依据现行版《中国药典》或其他国家药品标准进行检定, 并应符合相关要求。重组人白细胞介素-11 的检定内容按照生产阶段分为原液、半成品和成品检定。原液检定主要包括生物学活性、蛋白质含量、比活性、纯度、分子量、外源性 DNA 残留量、宿主菌蛋白质残留量、残余抗生素活性、细菌内毒素检查、等电点、紫外光谱、肽图、N 端氨基酸序列等; 半成品检定主要包括无菌检查、细菌内毒素检查等; 成品检定主要包括鉴别试验、外观、可见异物、装量差异、水分、pH 值、渗透压摩尔浓度、蛋白质含量、生物学活性、残余抗生素活性、无菌检查、细菌内毒素检查、异常毒性等。依据生产工艺的不同, 对于一些其他辅料例如羟胺残留量、甘氨酸含量等也需要进行检测并控制其添加范围。

生物学活性测定法

1 原理

IL-11 效价测定采用 B9-11 细胞株/MTT 比色法。适当浓度的 IL-11 对 B9-11 细胞具有剂量依赖性促增殖作用。MTT 在活细胞的线粒体中可以定量地被还原为 MTT Formazan，通过比色法测定 MTT Formazan 的量可以直接表示 B9-11 细胞的生长状态。制备一系列 IL-11 稀释溶液，按 50%最大效应点的稀释倍数可以折算为待检样品中 IL-11 的效价，测定结果需用 IL-11 效价测定用标准品校正。

2 材料和设备

2.1 材料

2.1.1 RPMI1640 培养液。

2.1.2 完全培养液：取 RPMI 1640 细胞培养液 950ml，加入新生牛血清 50ml，加 rhIL-11 至终浓度 50 单位/ml，4℃ 保存。

2.1.3 测活培养液：取 RPMI 1640 细胞培养液 950ml，加入新生牛血清 50ml。

2.1.4 PBS：称取 NaCl 8g，KCl 0.2g， Na_2HPO_4 1.44g， KH_2PO_4 0.24g，加超纯水溶解至 1000ml，经 121℃、15 分钟灭菌。

2.1.5 噻唑蓝 (MTT) 溶液：取 MTT 粉末 0.10g，溶于 PBS 20ml 中，配成每 1ml 含 5.0mg 的溶液，经 0.22 μm 滤膜过滤除菌，4℃ 避光保存。

2.1.6 裂解液：分析纯二甲亚砜 (DMSO) 或含 0.01mol/L 盐酸的 10% SDS 水溶液。

2.2 设备 酶标仪。

2.3 溶液制备

2.3.1 标准品溶液的制备：取重组人白介素-11 生物学活性测定标准品，按照说明书复溶后，用测活培养液稀释至每 1ml 含 1000 单位或适宜浓度。在 96 孔细胞培养板中，做 4 倍系列稀释，共 8 个稀释度，每个稀释度做 2 个孔，每孔分别留 50 μl 标准品溶液，弃去孔中多余溶液。以上操作在无菌条件下进行。

2.3.2 供试品溶液的制备：将供试品用测活培养液稀释成约每 1ml 含 1000 单位或适宜浓度。在 96 孔细胞培养板中，做 4 倍系列稀释，共 8 个稀释度，每个稀释度做 2 个孔，每孔分别留 50 μl 供试品溶液，弃去孔中多余溶液。以上操作在无菌条件下进行。

3 操作方法

B9-11 细胞用完全培养液于 37℃、5%二氧化碳条件下培养，传代后 24~72 小时用于生物学活性测定。将试验所用溶液预温至 37℃。取足量 B9-11 细胞培养物，离心收集细胞，用 RPMI1640 培养液洗涤 3 次，然后重悬于测活培养液，配成每 1ml 含 $2.0 \times 10^5 \sim 3.0 \times 10^5$ 个细胞的细胞悬液（根据细胞状态可适当调整接种密度），置 37℃ 备用。在加有标准品溶液和供试品溶液的 96 孔细胞培养板中每孔加入 50 μl 细胞悬液，于 37℃、5%二氧化碳条件下培养 40~48 小时。每孔加入 MTT 溶液 20 μl ，于 37℃、5%二氧化碳条件下培养 4~5 小时。以上操作在无菌条件下进行。每孔加入裂解液 100 μl ，混匀后（以 0.01mol/L 盐酸的 10%SDS 做裂解时，需放置适宜时间），放入酶标仪，以 630nm 为参比波长，于波长 570nm 处测定吸光度，记录测定结果。

4 结果计算

试验数据采用计算机程序或四参数回归算法进行处理，并按下式计算结果：

$$\text{供试品效价} = \text{标准品效价} \times \frac{\text{待检样品预稀释倍数}}{\text{标准品预稀释倍数}} \times \frac{\text{待检样品半效稀释倍数}}{\text{标准品半效稀释倍数}}$$

5 结果判定

成品的活性计算方法为测出数值与标示量比较，80%~150%为合格；原液则计算比活性。有特殊规定除外。

6 注意事项

6.1 B9-11 为非完全依赖性细胞，复苏后需多传几代，待细胞很好地适应培养环境后再进行测活试验。

6.2 实验时，要离心清洗细胞 3 次，以减少原培养基中 IL-11 的影响。

6.3 在梯度稀释过程中，由高浓度至低浓度更换移液器枪头。

6.4 当样品检测结果处于合格线“边缘”时，重复检测时带上经多次实验证实结果稳定的对照样品。

起草人：刘兰 毕华

复核人：饶春明 周勇

羟胺残留量测定法

1 原理

在碱性条件下，羟胺与碘反应生成亚硝酸，然后与对氨基苯磺酸发生重氮化反应，再与 α -萘胺偶联形成有色的偶氮化合物，采用紫外-可见分光光度法测定羟胺的含量。

2 材料与设备

2.1 材料

2.1.1 6% 乙酸钠溶液：称取无水乙酸钠 6g，加适量水溶解并稀释至 100ml 混匀，即得。

2.1.2 1% 对氨基苯磺酸溶液：称取对氨基苯磺酸 0.50g，加适量 25% 乙酸溶液溶解后稀释至 50ml，即得。

2.1.3 1.3% 碘溶液：称取碘 0.65g，溶于冰醋酸，稀释至 50ml，即得。于通风橱中配制和使用。

2.1.4 0.4mol/L 硫代硫酸钠溶液：称取硫代硫酸钠 3.16g，溶于适量水中，稀释至 50ml，即得。

2.1.5 0.6% α -萘胺溶液：称取 α -萘胺 0.3g，溶于 30% 乙酸，稀释至 50ml，即得。于通风橱中配制和使用。

2.2 设备 紫外-可见分光光度计。

3 操作方法

3.1 盐酸羟胺对照品溶液的制备 用水将盐酸羟胺对照品定量稀释至每 1ml 含 1000nmol, 作为贮备液。精密量取贮备液适量, 用水定量稀释至每 1ml 含 150nmol、120nmol、90nmol、60nmol 和 30nmol, 作为不同浓度的对照品溶液, 用前配制。

3.2 测定 精密量取供试品 0.3ml 置试管内, 依次加 6% 乙酸钠溶液 1.3ml、1% 对氨基苯磺酸溶液 0.2ml 及 1.3% 碘液 0.1ml, 混匀, 放置 10 分钟, 加 0.4mol/L 硫代硫酸钠溶液 50 μ l, 混匀脱色, 加 0.6% α -萘胺溶液 40 μ l, 混匀, 室温放置 60 分钟, 经每分钟 10000 转, 离心 5 分钟后, 取上清液, 按照紫外-可见分光光度法, 在波长 520nm 处测定吸光度。精密量取不同浓度的对照品溶液各 0.3ml, 置试管中, 自“依次加 6% 乙酸钠溶液 1.3ml”起, 同法操作。精密量取水 0.3ml 置试管中, 自“加 6% 乙酸钠溶液 1.3ml”起, 同法操作, 作为空白对照。

4 结果计算

以对照品溶液的羟胺浓度对相应吸光度作直线回归, 求得直线回归方程; 将测得的供试品的吸光度代入直线回归方程, 即得供试品的残留羟胺浓度 (nmol/ml), 再根据供试品的蛋白质含量按下式计算出羟胺残留量 (nmol/mg 蛋白质)。

供试品羟胺残留量 (nmol/mg 蛋白质) = 供试品羟胺残留浓度 (nmol/ml) / 供试品的蛋白质含量 (mg/ml)

5 结果判定

得到最终结果, 按照相关标准要求进行判定。

6 注意事项

6.1 离心取上清的操作一定要轻、缓, 避免取到沉淀物。

6.2 检测时, 对照品按照低浓度到高浓度的顺序进行; 对照品、待测样品、空白对照变换时要更换或将比色皿清洗干净。

起草人: 刘兰 毕华

复核人: 饶春明 周勇

重组人粒细胞刺激因子

简 述

粒细胞集落刺激因子 (G-CSF) 是科学家最早发现的几种集落刺激因子之一, 主要由活化

的单核细胞和巨噬细胞产生,作用于中性粒细胞系造血细胞的增殖、分化和活化。重组人粒细胞刺激因子(rhG-CSF)是利用基因重组技术在大肠埃希菌或中国仓鼠卵巢细胞(CHO)中表达纯化而成的重组蛋白药物。美国安进公司生产的rhG-CSF(Neupogen)于1991年被FDA批准上市,用于各种接受骨髓抑制性化疗的肿瘤病人,以避免因粒细胞减少症引起的感染和死亡。我国于1996年批准第一家rhG-CSF上市,目前已有15家企业生产rhG-CSF,其疗效与进口产品相当,主要用于各种原因引起的粒细胞减少症。目前国内市场上有两种来源的rhG-CSF,除日本中外制药株式会社生产的rhG-CSF(格拉诺赛特)为CHO细胞表达的糖蛋白外,其余均为大肠杆菌表达的无糖基化修饰蛋白。市场上流通的有75 μ g/支、150 μ g/支、300 μ g/支等多种规格。

重组蛋白药物的质量控制涉及药物生产的全过程,应对生产过程中的每一个工艺环节以及使用的每一种材料进行质量控制。重组人粒细胞刺激因子制品应依据现行版《中国药典》或其他国家药品标准进行检定,并应符合相关要求。检定内容按照生产阶段分为原液、半成品和成品检定。原液检定主要包括生物学活性、蛋白质含量、比活性、纯度、分子量、外源性DNA残留量、宿主菌蛋白质残留量、残余抗生素活性、细菌内毒素检查、等电点、紫外光谱、肽图、N端氨基酸序列等;半成品检定主要包括无菌检查、细菌内毒素检查等;成品检定主要包括鉴别试验、外观、可见异物、装量、pH值、渗透压摩尔浓度、重组人粒细胞刺激因子含量、生物学活性、残余抗生素活性、无菌检查、细菌内毒素检查、异常毒性等。本制品质量控制中具有特异性的检验项目为生物学活性测定和成品中重组人粒细胞刺激因子含量测定。

生物学活性测定法

1 原理

rhG-CSF生物学活性的测定,是根据其体内作用机制,利用rhG-CSF的依赖细胞株小鼠骨髓白血病细胞(NFS-60细胞),在体外验证药物的体内功能,并对其效价进行测定。NFS-60细胞的增殖速度随rhG-CSF剂量的增加而增快,有明显的量效关系。噻唑蓝(MTT)在活细胞的线粒体中可以定量地被还原为水不溶性的蓝紫色结晶甲臞(MTT Formazan),通过比色法测定MTT Formazan的量可以直接反应NFS-60活细胞的量,进而反应rhG-CSF的量。rhG-CSF的效价测定采用NFS-60细胞株/MTT比色法,通过与已有活性单位赋值的rhG-CSF效价测定用国家标准品比对,获得rhG-CSF生物学活性的单位,即其效价。

2 材料和设备

2.1 材料

2.1.1 基础培养液: RPMI1640培养液添加10%FBS。

2.1.2 完全培养液: 基础培养液添加rhG-CSF至终浓度20ng/ml, 4 $^{\circ}$ C保存,使用期限不得超过基础培养液有效期。

2.1.3 PBS缓冲液: 取8g NaCl、0.2g KCl、1.44g Na₂HPO₄、0.24g KH₂PO₄用蒸馏水配成1000ml的溶液,高压灭菌,室温保存,有效期12个月。

2.1.4 MTT溶液: 用PBS缓冲液配制成5.0mg/ml的溶液,经0.22 μ m滤膜过滤除菌,4 $^{\circ}$ C避光保存,有效期6个月。每次实验前检查,发现蓝色沉淀者应重新配制。

2.1.5 裂解液：含 1%浓盐酸、10%Triton X-100 的异丙醇溶液，室温避光保存，有效期 6 个月。

2.1.6 NFS-60 细胞：用完全培养液于 37℃、5%二氧化碳条件下培养。镜检 NFS-60 细胞应呈光滑球状，分散悬浮，具良好折光性。

2.1.7 标准品：rhG-CSF 效价测定用国家标准品。

2.2 设备 二氧化碳细胞培养箱、超净工作台、离心机、酶标仪、微量加样器、96 孔细胞培养板、Eppendorf 管。

3 操作方法（各步骤均值超净工作台中进行）

3.1 标准品溶液制备 取 1 支重组人粒细胞刺激因子生物学活性测定标准品按说明书复溶，用基础培养液稀释至 50~300IU/ml。在 96 孔细胞培养板中做 2 倍系列稀释，共 8 个稀释度，每个稀释度 2 个复孔，每孔留 50μl，弃去孔中多余溶液。

3.2 供试品溶液的制备 将供试品按标示量复溶后，用基础培养液稀释至 50~300IU/ml。在 96 孔细胞培养板中做 2 倍系列稀释，共 8 个稀释度，每个稀释度 2 个复孔，每孔留 50μl，弃去孔中多余溶液。

3.3 细胞制备 NFS-60 细胞传代后 24~36 小时可用于 rhG-CSF 效价测定。取足量 NFS-60 细胞，离心，用 RPMI1640 培养液洗涤 3 次，用基础培养液配制成 2.0×10^5 /ml 的悬液，加入上述配制好的含有 50μl 标准品和供试品溶液的孔中，50μl/孔，于 37℃，5%CO₂ 条件下培养。

3.4 显色及测定 培养 40~48 小时后，加入 MTT 溶液 20μl/孔，于 37℃，5%CO₂ 条件下培养 5 小时。加入裂解液 100μl/孔，混匀后放入酶标仪，以 630nm 为参比波长，在波长 570nm 处测定吸光值，记录测定结果。

4 结果计算

试验数据采用四参数回归算法进行处理，并按下式计算结果：

$$\text{供试品生物学活性 (IU/ml)} = P_r \times \frac{D_s \times E_s}{D_r \times E_r}$$

式中 P_r 为标准品生物学活性，IU/ml； D_s 为供试品预稀释倍数； D_r 为标准品预稀释倍数； E_s 为供试品相当于标准品半效量的稀释倍数； E_r 为标准品半效量的稀释倍数。

注：显色方法也可采用经等效验证的其他显色方法。

5 结果判定

标准品及供试品的拟合线性 $R^2 \geq 0.90$ ，标准品最大（或最小）稀释度对应的吸光值与供试品最大（或最小）稀释度对应的吸光值之间应无统计学差异；标准品四参数曲线和供试品四参数曲线的曲线斜率应无统计学差异（即曲线平行），标准品和供试品的半效稀释度之比应在 0.5~2.0 之间；标准品及供试品的最大稀释度与最小稀释度对应的吸光值之比应在两倍以上。

原液生物学活性可通过比活性判断，即每毫克蛋白的生物学活性不低于 6.0×10^7 IU；成品生物学活性为与标示量对比的相对生物学活性，要求应为标示量的 80%~150%。

6 注意事项

6.1 为保证实验结果的准确性，应在每一步稀释过程中更换移液器“枪头”，并规范移液器的使用手法。

6.2 在用 RPMI1640 培养液洗涤细胞时，为保证将完全培养液中的 rhG-CSF 清洗干净，每次洗涤液用量应不少于 10ml。

起草人：刘兰 范文红

复核人：饶春明 周勇

蛋白质含量测定法

1 原理

重组人粒细胞刺激因子成品中，活性蛋白含量极微，多为微克级，制剂中常含有大量白蛋白作为辅料，因此难于用 Lowry、BCA 等常规方法进行蛋白含量测定。本方法采用反相高效液相色谱法（RP-HPLC）将重组人粒细胞刺激因子成品中的活性成分与其他辅料成分进行有效分离，再利用重组人粒细胞集落刺激因子蛋白含量测定国家标准品和外标法对制剂中重组人粒细胞刺激因子蛋白含量进行测定。

2 材料和设备

2.1 材料 20mmol/L 醋酸-醋酸钠缓冲液（pH4.0）、流动相 A 液（0.1%三氟乙酸的水溶液）、流动相 B 液（0.1%三氟乙酸的乙腈溶液）。细胞集落刺激因子蛋白含量测定国家标准品（批号：2700023-200801）。

2.2 设备 色谱仪：高效液相色谱仪；色谱柱：采用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂，孔径 30nm，粒度 5 μ m，直径 4.6mm，长 250mm。

3 操作方法

3.1 色谱仪参数设定 柱温 25~35 $^{\circ}$ C，供试品保存温度 2~8 $^{\circ}$ C，检测波长 214nm。

3.2 标准品及供试品稀释 取 1 支标准品，按说明书复溶。用 20mmol/L 醋酸-醋酸钠缓冲液（pH4.0）将标准品及供试品调节至相同蛋白质浓度，将供试品溶液与标准品溶液以相同体积分别注入液相色谱仪（进样体积不小于 10 μ l，进样量 4~6 μ g），按下表进行梯度洗脱。标准品溶液、供试品溶液均进样三次，记录色谱图并计算峰面积。

时间	时间/分钟	A/%	B/%
1	0	60	40
2	40	20	80
3	45	0	100
4	50	60	40
5	60	60	40

4 结果计算

按下式计算重组人粒细胞刺激因子蛋白质含量：

$$\text{供试品蛋白质含量} (\mu\text{g/ml}) = \frac{C_R \times A_x \times n_x}{A_R \times n_R}$$

式中 C_R 为复溶所得标准品溶液的蛋白质含量， $\mu\text{g/ml}$ ； A_R 为标准品溶液的平均峰面积； A_x 为供试品溶液的平均峰面积； n_R 为标准品溶液的稀释倍数； n_x 为供试品溶液的稀释倍数。

5 结果判定

除另有规定外，成品中重组人粒细胞集落刺激因子含量应为标示量的 90%~130%。

6 注意事项

样品在检测前应充分溶解；仪器如无在线脱气功能，流动相在使用前应进行超声脱气。

起草人：韩春梅 范文红

复核人：饶春明 周勇

重组人粒细胞巨噬细胞刺激因子

简 述

注射用重组人粒细胞巨噬细胞刺激因子（rhGM-CSF）是人体内源性粒细胞巨噬细胞集落刺激因子的模拟分子，由 128 个氨基酸残基构成的蛋白质。主要用于预防和治疗肿瘤放疗或化疗后引起的白细胞减少症、治疗骨髓造血功能障碍及骨髓增生异常综合征、预防白细胞减少可能潜在的感染并发症、使感染引起的中性粒细胞减少的恢复加快。

本品首先由美国 Immunex 公司研制成功，于 1991 年获得 FDA 批准生产。最早进入国内市场的是先灵葆雅公司生产的生白能。目前，我国已批准生产的注射用重组人粒细胞巨噬细胞刺激因子药品批准文号 34 个，分布于 12 家制药企业，剂型为冻干粉针剂，规格包括：75 μg /支、100 μg /支、150 μg /支、300 μg /支等多种规格。2010 年版《中国药典》记载名称变更为注射用重组人粒细胞巨噬细胞刺激因子。

本品依据《中国药典》或其他国家药品标准进行检定，结果应符合相关规定。检定内容按照生产阶段可分为原液、半成品和成品检定，其中原液检验项目包括：生物学活性、蛋白质含量、比活性、电泳纯度、高效液相纯度、分子量、外源性 DNA 残留量、宿主菌蛋白质残留量、残余抗生素活性、细菌内毒素检查、等电点、紫外光谱、肽图、N 端氨基酸序列等；成品检验

项目包括：鉴别试验、外观、可见异物、装量差异、水分、渗透压摩尔浓度、生物学活性、残余抗生素活性、无菌检查、细菌内毒素检查、异常毒性等。

本品质量标准中检测方法具有特异性的检验项目为生物学活性测定，下面对该检验项目进行重点介绍。

生物学活性测定法

1 原理

该方法用于检测重组人粒细胞巨噬细胞刺激因子(rhGM-CSF)原液和成品的生物学活性。人红细胞白血病细胞(TF-1细胞)的生长状况因rhGM-CSF生物学活性的不同而不同，即量效关系呈现正相关。再利用活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使外源性MTT(商品名：噻唑蓝)定量还原为水不溶性的蓝紫色结晶甲臞(MTT Formazan)，并沉积在细胞内使细胞死亡，而死亡细胞不再具有此种转换功能。TF-1细胞中线粒体数量基本稳定并且琥珀酸脱氢酶的量基本恒定，从而使产物甲臞与细胞数量相联系，起到定量细胞的作用。甲臞可溶解于二甲基亚砜(DMSO)溶液或SDS等溶液，并在570nm波长产生最大可见光吸收，用酶标仪检测光吸收值即可建立光吸收值与细胞数量间的联系。在一定细胞数范围内，甲臞溶解液光吸收值与细胞数成正比。一般情况为降低溶液中颗粒物干扰，采用630nm波长吸光值作为参比进行570nm吸光值扣除。标准品和样品分别拟合量效关系的四参数方程(一种特殊的平行线法)，并用平行线法在标准品和样品间进行量值传递，即用标准品生物学活性量值作为参考测定样本生物学活性。

2 材料和设备

2.1 材料

2.1.1 基础培养液：RPMI 1640培养液添加10%FBS(小牛血清)，置于灭菌后的容器中，4℃条件下保存。

2.1.2 完全培养液：基础培养液添加rhGM-CSF至终浓度5ng(80IU)/ml。置于灭菌后的容器中，4℃条件下保存。

2.1.3 PBS缓冲液：取8g NaCl、0.2g KCl、1.44g Na₂HPO₄、0.24g KH₂PO₄用蒸馏水配成1000ml的溶液，经121℃、15分钟高压灭菌。

2.1.4 MTT溶液：用PBS缓冲液配制成5.0mg/ml的溶液，经0.22μm滤膜过滤除菌，4℃条件下避光保存。

2.1.5 裂解液：14ml盐酸(HCl)，50ml Triton X-100的溶液，加异丙醇溶液制成500ml溶液，室温避光保存。

2.1.6 TF-1细胞：用完全培养液于37℃、5%二氧化碳条件下培养。

2.1.7 标准品：重组人粒细胞巨噬细胞刺激因子活性测定国家标准品。

2.2 设备 二氧化碳细胞培养箱、超净工作台、离心机、酶标仪、微量加样器、96孔细胞培养板、Eppendorf管。

3 操作方法(各步骤均值超净工作台中进行)

3.1 标准品溶液的制备 取1支rhGM-CSF生物学活性测定标准品按说明书复溶，用基础培养液稀释至10~20IU/ml。在96孔细胞培养板中做2倍系列稀释，共8个稀释度，每个稀

释度 2 个复孔，每孔分别留 50 μ l 标准品溶液，弃去孔中多余溶液。

3.2 供试品溶液的制备 将供试品按标示量复溶后，用基础培养液稀释至 10~20IU/mL。在 96 孔细胞培养板中做 2 倍系列稀释，共 8 个稀释度，每个稀释度 2 个复孔，每孔分别留 50 μ l 标准品溶液，弃去孔中多余溶液。

3.3 细胞制备 TF-1 细胞传代用完全培养基传代后，于 37 $^{\circ}$ C，5%CO₂ 条件下培养 24~36 小时。离心收集并用基础培养液洗涤 3 次，配制成约 4.0 \times 10⁵/ml 的细胞悬液，加入上述配制好的含有 50 μ l 标准品和供试品溶液的孔中，在 37 $^{\circ}$ C，5%CO₂ 条件下培养 48~52 小时。

3.4 显色及测定 加入 MTT 溶液 20 μ l/孔，于 37 $^{\circ}$ C，5% CO₂ 条件下培养 5 小时。加入裂解液 100 μ l/孔，混匀后放入酶标仪，以 630nm 为参比波长，在波长 570nm 处测定吸光值，记录测定结果。

4 结果计算

试验数据采用计算机程序或四参数回归算法进行处理，并按下式计算结果：

$$\text{供试品生物学活性 (IU/ml)} = P_r \times \frac{D_s \times E_s}{D_r \times E_r}$$

式中 P_r 为标准品生物学活性，U/ml； D_s 为供试品预稀释倍数； D_r 为标准品预稀释倍数； E_s 为供试品相当于标准品半效量的稀释倍数； E_r 为标准品半效量的稀释倍数。

5 结果判定

检测结果可以通过相应软件完成计算直接得到，也可通过手工计算得到。检测结果是否可以被接受通常考虑以下几个方面：四参数方程的拟合优度 (R^2) 通常要求不低于 90%；标准品稀释度中的最大（或最小）吸光值与供试品稀释度中的最大（或最小）吸光值之间应无统计学差异；标准品四参数曲线和供试品四参数曲线的曲线斜率应无统计学差异（即曲线平行）；标准品和供试品的半效稀释度之比应在 0.5~2.0 之间；标准品各稀释度中极值差应具有统计学差异，供试品同理。

原液生物学活性可通过比活性判断，即每毫克蛋白的生物学活性（rhGM-CSF 为 $\geq 1.0 \times 10^7$ IU/mg）；成品生物学活性为与标示量对比的相对生物学活性，要求应为标示量的 80%~150%。

6 注意事项

本方法需要无菌保障体系和无菌操作；为保证实验结果的准确性和排除稀释过程中残留的干扰应在每一步稀释过程中更换“枪头”，并规范移液器的使用手法；在标准品和供试品的稀释过程和细胞悬液的制备过程中充分混匀非常重要；由于完全培养基中含有一定量的 rhGM-CSF，在制备检测细胞时需要尽力清洗去除细胞周围的 rhGM-CSF，但清洗的时间不宜过长，因为 TF-1 细胞长时间失去 rhGM-CSF 经转入不可逆的凋亡状态。推荐条件：每分钟约 1000 转，离心 5 分钟，清洗次数不超过 3 次，总时长不超过 1 小时。如果需要对供试品进行标定建议增加检测重复次数至 6 次，然后取平均值。

起草人：史新昌 刘兰

复核人：饶春明 周勇

重组牛碱性成纤维细胞生长因子

简 述

重组牛碱性成纤维细胞生长因子 (rb-bFGF) 是利用基因重组技术, 将牛碱性成纤维细胞生长因子的基因克隆至表达载体上, 转化感受态细胞后在大肠埃希菌中进行表达的蛋白类药物。rb-bFGF 药物在伤口修复、加速愈合和减少疤痕中具有重要的作用。目前, 该药物已被列入中国国家报销药物清单, 主要用于治疗各种慢性创面 (包括糖尿病足部溃疡、褥疮和慢性肉芽创面等)、新鲜创面 (包括外伤和手术等)、各种烧烫伤创面 (包括浅 II 度、深 II 度、肉芽创面等) 和各种原因引起的角膜上皮缺损和点状角膜病变、复发性浅层点状角膜病变、轻中度干眼症、大泡性角膜炎、角膜擦伤、轻中度化学烧伤、角膜手术及术后愈合不良、地图状 (或营养性) 单疱性角膜溃疡等。

我国上市的重组牛碱性成纤维细胞生长因子包括外用溶液、冻干粉、凝胶和滴眼液四种剂型。不同剂型的药物应依据现行版《中国药典》或其他经批准的国家药品标准进行检定, 并应符合相关要求。重组牛碱性成纤维细胞生长因子的检定内容按照生产阶段分为原液、半成品和成品检定。原液检定主要包括生物学活性、蛋白质含量、比活性、纯度、分子量、外源性 DNA 残留量、等电点、紫外光谱和肽图; 半成品检定主要包括生物学活性和无菌检查; 成品检定主要包括鉴别试验、外观、可见异物、复溶时间、装量、水分、pH 值、生物学活性和无菌检查。

生物学活性测定法

1 原理

重组牛碱性成纤维细胞生长因子的生物学活性采用细胞增殖法/MTT 比色法进行测定, 主要以药物促进小鼠胚胎成纤维细胞 (BALB/c 3T3) 的增殖为基础, 根据 BALB/c 3T3 细胞的生长状况反映重组牛碱性成纤维细胞生长因子的生物学活性。将不同浓度的重组牛碱性细胞生长因子加入至 BALB/c 3T3 细胞中, 培养适宜的时间后, 加入噻唑蓝 (MTT), 活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能定量的将 MTT 还原为水不溶性的蓝紫色结晶甲臞, 而死细胞无此作用。向细胞中加入二甲基亚砜 (DMSO) 溶解细胞中的甲臞, 通过比色法测定其吸光度值可以间接反应 BALB/c 3T3 活细胞的数量。在一定细胞数量范围内, 甲臞的生成量与细胞数量成正相关, 根据吸光度值的结果进行定量分析。测定结果需要用品重组牛碱性成纤维细胞生长因子的国家标准品进行校正。

2 材料和设备

2.1 材料

2.1.1 标准品 重组牛碱性成纤维细胞生长因子国家标准品 (效价: 7000IU/支, 批号: 96/01)。

2.2 设备 酶标仪、倒置显微镜、细胞计数仪和 CO₂ 培养箱。

2.3 溶液制备

2.3.1 RPMI 1640 培养液：商品化的市售产品。

2.3.2 新生牛血清：商品化的市售产品。

2.3.3 裂解液：二甲基亚砜（DMSO），商品化的市售产品。

2.3.4 0.25%乙二胺四乙酸二钠（EDTA）-胰酶：商品化的市售产品。

2.3.5 完全培养液：量取新生牛血清 100ml，加 RPMI 1640 培养液至 1000ml。

2.3.6 维持培养液：量取新生牛血清 4ml，加 RPMI 1640 培养液至 1000ml。

2.3.7 PBS 缓冲液：称取 8g NaCl、0.2g KCl、1.44g Na₂HPO₄、0.24g KH₂PO₄，加去离子水溶解并定容至 1000ml。经 121℃，15 分钟高压灭菌备用。

2.3.8 噻唑蓝（MTT）溶液：用 PBS 缓冲液配成 5.0mg/ml 的溶液，经 0.22μm 滤膜过滤除菌，分装，4℃ 条件下避光保存。使用期限不得超过 6 个月。每次实验前检查，若发现蓝色沉淀应重新配制。

3 操作方法

3.1 0.25% EDTA-胰酶消化 BALB/c 3T3 细胞并用完全培养液重悬，调整细胞密度至 $5.0 \times 10^4 \sim 1.0 \times 10^5$ 个/ml，接种于 96 孔细胞培养板中，每孔 100μl。37℃，5% 二氧化碳条件下培养 18~24 小时。

3.2 吸去各孔中的完全培养液，每孔加入 100μl 维持培养液。37℃，5%二氧化碳条件下继续培养 18~24 小时。

3.3 标准品溶液的制备：取重组牛碱性成纤维细胞生长因子国家标准品，按照说明书复溶，用维持培养液稀释至 40IU/ml。

3.4 供试品的准备：将供试品按照说明书复溶或称量，用维持培养液稀释至 40IU/ml 或 40ng/ml。根据供试品的标示效价进行分步稀释，每步稀释倍数不得超过 10 倍。

3.5 将预稀释的标准品和供试品进行 4 倍比稀释，共 8 个稀释度，每个稀释度做 2 个复孔。

3.6 吸去各孔细胞中的维持培养液，将倍比稀释的标准品和供试品按照对应位置加入细胞中，每孔 100μl。37℃，5%二氧化碳条件下培养 64~72 小时。

3.7 向各孔细胞中加入 20μl MTT 溶液，37℃，5%二氧化碳条件下培养 5 小时。

3.8 打开酶标仪电源及电脑，仪器自检通过后，设置样品模板排列、检测参数及检测方法。

3.9 弃去细胞中的液体，每孔加入 100μl 裂解液。

3.10 充分混匀，以 630nm 作为参比波长，在波长 570nm 处测定吸光度，记录实验结果。检测完毕后，关闭酶标仪及电脑开关。

4 结果计算

采用计算机程序或四参数回归方法进行数据处理，并按下式计算实验结果：

$$\text{供试品效价} = \text{标准品效价} \times \frac{\text{供试品预稀释倍数}}{\text{标准品预稀释倍数}} \times \frac{\text{供试品半效稀释倍数}}{\text{标准品半效稀释倍数}}$$

5 结果判定

除另有规定外，应符合以下要求：

- 5.1 标准品和供试品四参数拟合线性 $R^2 \geq 0.90$ 。
- 5.2 标准品和供试品四参数曲线的斜率无统计学差异（即曲线平行）。
- 5.3 生物学活性应为标示量的 70%~200%。

6 注意事项

- 6.1 除酶标仪测定外，其余步骤应在无菌条件下操作，避免细胞污染。
- 6.2 标准品和供试品的预稀释及倍比稀释要准确，保证操作一致。
- 6.3 吸去培养液时操作要轻，避免细胞脱落。

7 备注

显色方法也可以采用等效验证的其他显色方法，例如：MTS 和 CCK8。

起草人：姚文荣 刘兰
复核人：饶春明 周勇

重组人表皮生长因子

简 述

重组人表皮生长因子（rhEGF）是利用基因重组技术，在大肠埃希菌或酵母菌中高效表达的一种活性蛋白。rhEGF 由 53 个氨基酸残基组成，分子内有 6 个半胱氨酸残基组成的二硫键，形成 3 个分子内环型结构，组成生物活性所必须的受体结合区域，无糖基部位，非常稳定，耐热耐酸。重组人表皮生长因子衍生物是在天然 EGF 的 N 端增加 3 个氨基酸残基：Ala-Arg-Ile，主体分子结构和生物学活性等方面，与天然 EGF 基本一致。重组人表皮生长因子及其衍生物能够有效促进各种表皮组织生长，在医学上主要用于烧伤、烫伤、溃疡、各类创伤以及角膜损伤等的治疗。

我国率先在全球实现 rhEGF 的产业化生产并成功上市。目前，我国已批准生产的 rhEGF 药品批准文号 12 个，分布于 3 家制药企业，其中 rhEGF 9 个，包含外用冻干粉剂、凝胶和滴眼液；rhEGF 衍生物 3 个，包含外用溶液和滴眼液。目前，《中国药典》先后收录了外用重组人表皮生长因子，重组人表皮生长因子外用溶液（I）、重组人表皮生长因子凝胶（酵母）和重组人表皮生长因子滴眼液（酵母）。

目前，国内生产的 rhEGF 既有大肠埃希菌表达，也有酵母菌表达；rhEGF 衍生物为大肠埃希菌表达。剂型包括外用冻干剂、外用液、凝胶和滴眼液。作为人用重组 DNA 蛋白制品，需进行全程质量控制，其质控体系主要包括原、辅料质量控制，生产工艺和过程控制及制品检定

等。需采用适宜的标准品和经验证的方法评价其安全性和有效性，保证药品质量，而质量标准是药品质量控制的重要依据。

rhEGF 及其衍生物依据现行版《中国药典》三部进行检定，根据表达体系、剂型的不同，质控项目及相应的质量标准也有所不同。原液的质控项目，包括生物学活性、蛋白质含量、比活性、电泳纯度、高效液相纯度、分子量、等电点、紫外光谱、肽图、N 端氨基酸序列、外源性 DNA 残留量、宿主菌蛋白质残留量和甲醇含量（仅酵母菌表达体系）、残余抗生素活性（仅大肠埃希菌表达体系）；成品的质控项目共计 9 项，包括鉴别试验、外观、可见异物和渗透压摩尔浓度（仅滴眼液）、装量、pH 值、水分（仅外用冻干剂）、生物学活性、无菌检查。

生物学活性测定法

1 原理

本法为小鼠胚胎成纤维细胞（BALB/c 3T3 细胞）增殖法/MTT 比色法，适用于重组人表皮生长因子和重组人表皮生长因子衍生物生物学活性测定，现收载于《中国药典》三部。基本原理是在低血清浓度条件下（一般为 0.4%），rhEGF 对 3T3 细胞的生长具有促进作用。随着培养液中 rhEGF 浓度的升高，活细胞数量增加，用活细胞染料噻唑蓝（MTT）显色后测定活细胞的数量。通过比较标准品 rhEGF 和待测 rhEGF 的半效稀释度，计算待测 rhEGF 的效价。

2 材料和设备

2.1 材料

2.1.1 标准品：rhEGF 效价测定用标准品。

2.1.2 基础培养液：1640 培养液。

2.1.3 维持培养液：基础培养液添加 0.4%FBS，4℃条件下保存。

2.1.4 完全培养液：基础培养液添加 10%FBS，4℃条件下保存。

2.1.5 PBS 缓冲液：取 8g NaCl、0.2g KCl、1.44g Na₂HPO₄、0.24g KH₂PO₄ 用蒸馏水配成 1000ml 的溶液，经 121℃、15 分钟高压灭菌。

2.1.6 MTT 溶液：用 PBS 缓冲液配制制成 5.0mg/ml 的溶液，经 0.22μm 滤膜过滤除菌。置于灭菌后的容器中，4℃条件下避光保存。

2.1.7 BALB/c 3T3 细胞：用完全培养液于 37℃、5%二氧化碳条件下培养。

2.2 设备 二氧化碳细胞培养箱、超净工作台、离心机、酶标仪、微量加样器、96 孔细胞培养板、Eppendorf 管。

3 操作方法（各步骤均置超净工作台中进行）

3.1 标准品溶液的制备 取 1 支 rhEGF 效价测定用标准品按说明书复溶，用维持培养液稀释至 50IU/mL。在 96 孔细胞培养板中做 4 倍系列稀释，共 8 个稀释度，每个稀释度 2 个复孔。

3.2 供试品溶液的制备 将供试品按标示量复溶后，用基础培养液稀释至 50IU/ml。在 96 孔细胞培养板中做 4 倍系列稀释，共 8 个稀释度，每个稀释度 2 个复孔。

3.3 细胞制备 BALB/c 3T3 细胞株用完全培养液于 37℃、5%二氧化碳条件下培养，控制细胞浓度为每 1ml 含 $1.0 \times 10^5 \sim 5.0 \times 10^5$ 个细胞，传代后 24~36 小时用于生物学活性测定。弃去培养瓶中的培养液，消化和收集细胞，用完全培养液配成每 1ml 含 $5.0 \times 10^4 \sim 8.0 \times 10^4$ 个细胞

的细胞悬液，接种于 96 孔细胞培养板中，每孔 100 μ l，于 37 $^{\circ}$ C、5%二氧化碳条件下培养。24 小时后换成维持培养液，于 37 $^{\circ}$ C、5%二氧化碳条件下培养 24 小时。制备的细胞培养板弃去维持液，加入标准品溶液和供试品溶液，每孔 100 μ l，于 37 $^{\circ}$ C、5%二氧化碳条件下培养 64~72 小时。

3.4 显色及测定 加入 MTT 溶液 20 μ l/孔，于 37 $^{\circ}$ C，5%CO₂条件下培养 5 小时。加入甲基亚砷 100 μ l/孔，混匀后放入酶标仪，以 630nm 为参比波长，在波长 570nm 处测定吸光值，记录测定结果。

4 结果计算

试验数据采用计算机程序或四参数回归算法进行处理，并按下式计算结果：

$$\text{供试品生物学活性 (IU/ml)} = P_r \times \frac{D_s \times E_s}{D_r \times E_r}$$

式中 P_r 为标准品生物学活性，IU/ml； D_s 为供试品预稀释倍数； D_r 为标准品预稀释倍数； E_s 为供试品相当于标准品半效量的稀释倍数； E_r 为标准品半效量的稀释倍数。

5 结果与判定

5.1 除另有规定外，应符合以下要求：

5.1.1 量效曲线的 $R^2 \geq 0.90$ 。

5.1.2 供试品的量效曲线应与标准品基本平行。

5.2 结果判定 原液的比活性应不低于 5.0×10^5 IU/mg；成品的生物学活性应为标示量的 70%~200%。

6 注意事项

6.1 维持培养液中血清浓度可采用实验条件下优化后的参数。

6.2 更换培养液时应尽可能去除残留液体，同时应小心操作，避免细胞脱落。

6.3 显色方法也可采用经等效验证的其他显色方法。

起草人：于雷 史新昌

复核人：饶春明 周勇

重组链激酶

简 述

链激酶是最早用于溶栓的药物，天然链激酶（SK）是由溶血性链球菌的 A、C、G 族产生

的,是机体血纤维蛋白溶酶原(Plg)最有效的活化剂之一,具有促进体内纤维蛋白溶解系统的活力,使无活性的纤溶酶原转变为有活性的纤溶酶,引起血栓内部崩解和血栓表面溶解。天然链激酶对血栓没有选择性,过多的降解纤维蛋白原,会导致出血等严重不良反应。基因重组链激酶采用基因工程方法将目的基因克隆到载体,转化大肠埃希菌后得到SK工程菌,通过大肠埃希菌表达的SK以包涵体形式存在,破菌后得到的包涵体经过复性、分离、纯化,分装、冻干制成,它的抗原性弱于天然的链激酶,主要用于急性心肌梗死的治疗。

重组链激酶制品应依据现行版《中国药典》或其他国家药品标准进行检定,并应符合相关要求。重组链激酶的检定内容按照生产阶段分为原液、半成品和成品检定。原液检定主要包括生物学活性、蛋白质含量、比活性、纯度、分子量、外源性DNA残留量、宿主菌蛋白质残留量、残余抗生素活性、细菌内毒素检查、等电点、紫外光谱、肽图、N端氨基酸序列等;半成品检定主要包括无菌检查、细菌内毒素检查等;成品检定主要包括鉴别试验、外观、可见异物、装量、水分、渗透压摩尔浓度、生物学活性、残余抗生素活性、无菌检查、细菌内毒素检查、异常毒性等。依据生产工艺的不同,对于一些其他辅料例如对羟基苯甲酸甲酯、聚山梨酯80等也需要进行检测并控制其添加范围。

生物学活性测定法

1 原理

生物学活性测定是重组链激酶有效性的重要质控指标。溶栓药物的生物学活性测定多采用体外模拟血栓的形成和溶解的方法,主要方法有发色底物法、气泡上升法、纤维蛋白平板溶圈法等。

重组链激酶生物学活性测定采用纤维蛋白平板溶圈法,其实验原理为:人纤维蛋白原在凝血酶的作用下形成纤维蛋白凝块,加入到融化的琼脂糖溶液中,同时加入纤溶酶原(Plg),制备成白色的纤维蛋白平板;链激酶首先和纤溶酶原形成复合物,激活游离的Plg成为有活性的纤溶酶,纤溶酶能降解人纤维蛋白为可溶性的纤维蛋白片段,在纤维蛋白平板上出现透明的溶解圈,以此定量测定重组链激酶的生物学活性。

2 材料与设备

2.1 材料

2.1.1 试剂 琼脂糖:电泳级高强度琼脂糖;0.9%氯化钠溶液;凝血酶溶液:人凝血酶用0.9%氯化钠溶液100IU/ml,分装成30 μ l/管,于-20 $^{\circ}$ C保存;纤溶酶原溶液:人纤溶酶原用0.9%氯化钠溶液溶解成0.5mg/ml,分装300 μ l/管,于-20 $^{\circ}$ C保存;纤维蛋白原溶液:人纤维蛋白原实验前配制,配制前先在37 $^{\circ}$ C水浴预热15分钟,用0.9%氯化钠溶液使其完全溶解,配成6mg/ml的溶液待用。

2.1.2 标准品 重组链激酶国家标准品,批号:96/01,效价:500IU/支。

2.2 仪器设备 天平、恒温水浴箱。

3 操作方法

3.1 制备纤维蛋白平板 称取琼脂糖125mg,加0.9%氯化钠溶液23ml,煮沸使之溶胀,置55~60 $^{\circ}$ C水浴中平衡,加每1ml含100IU人凝血酶溶液14 μ l,加每1ml含0.5mg人纤溶酶原溶液280 μ l,边加边摇匀,加每1ml含6mg人纤维蛋白原溶液2.2ml,不停地摇匀,浑浊后立

即倒入直径 8cm 的平板中，水平放置充分凝固后，4℃放置至少 30 分钟待用。

3.2 标准品的稀释 按使用说明书，将重组链激酶生物学活性测定国家标准品复溶后，用生理氯化钠溶液稀释成每 1ml 含 1000IU、250IU、62.5IU、15.6IU、3.9IU 5 个稀释度溶液，待用。

3.3 供试品的稀释 供试品按标示量加 0.9%氯化钠溶液复溶后，用 0.9%氯化钠溶液稀释至约每 1ml 含 100IU 或 1μg。

3.4 打孔点样 在含纤维蛋白平板内打孔，孔径为 2mm，在孔内分别加入供试品溶液和标准品溶液，每孔 10μl，每个稀释度做 2 孔，37℃湿盒水平放置 24 小时。纵向和横向量取溶圈直径，各 2 次，取平均值。

4 结果计算

以标准品溶液各个稀释度的生物学活性的对数为横坐标，相对应的溶圈直径的对数为纵坐标，做标准曲线，求得直线回归方程，根据供试品的溶圈直径的对数求得供试品的生物学活性。

5 结果与判定

根据样品的预稀释倍数计算结果，按照相关质量标准要求判定结果。

6 注意事项

制备纤维蛋白平板时，待充分凝固后方可移至 4℃冰箱并保持 30 分钟以上，应在 2 天之内使用。

起草人：丁有学 史新昌

复核人：饶春明 周勇

神经生长因子

简 述

神经生长因子（NGF）是一种由 118 个氨基酸组成的蛋白质，是维持交感神经元和感觉神经元生长、发育和功能所必需的营养因子。我国是世界上第一个批准注射用鼠神经生长因子（mNGF）上市的国家。2009 年注射用鼠神经生长因子进入国家医保目录，2015 年收入《中国药典》三部。这是我国第一个在神经系统治疗领域拥有自主知识产权的药物，系从小鼠颌下腺中分离纯化的神经生长因子（mNGF），纯度可达 98%以上，与人体神经生长因子的结构具有高度的同源性，生物效应也无明显的种间特异性；可以提高受损细胞存活率，促进髓鞘形成、促

进受损神经纤维沿正确方向生长, 驱使生长的神经纤维定位于靶细胞, 形成功能性连接。鼠神经生长因子 (mNGF) 的适应症主要是促进神经损伤恢复, 用于治疗视神经损伤, 以及正己烷重度性周围神经病。

由于现阶段国内生产的神经生长因子 (NGF) 为鼠颌下腺提取, 要针对制品的蛋白质特性判定来进行制品的质量控制, 鉴别实验 (western blot) 确认了神经生长因子 (NGF) 蛋白, 等电聚焦电泳、分子量、紫外最大吸收波长、电泳纯度、高效液相纯度等确认了神经生长因子 (NGF) 特异的理化性质。但如果是重组生产的神经生长因子 (NGF) 还需要增加 N 端 15 个氨基酸序列测定、残留宿主蛋白和残留宿主菌 DNA 测定等项目。在鼠颌下腺提取的神经生长因子 (NGF) 中, 由于原料动物可能污染病毒, 虽然纯化工艺已保证了目标蛋白纯度, 但为确保最终制品的安全性, 应对原液中鼠源性病毒、成品中外源病毒污染进行检测。

鼠神经生长因子 (mNGF) 质量标准参考目前现行版《中国药典》三部, 质控项目总计 28 项, 生物制品常规的物理检查、水分、细菌内毒素、无菌检查、蛋白质含量外, 如工艺中采用磷酸三丁酯、聚山梨酯 80、辛酸钠, 则还要检测它们的残留量。鼠神经生长因子 (mNGF) 特异性检查 3 项, 分别为含量检查 (酶联免疫或高效液相法)、生物学活性 (鸡胚背根神经节或细胞法) 测定及外源病毒污染检查 (BHK21 细胞培养法)。

含量测定法

第一法: 酶联免疫 (ELISA) 夹心法

1 原理

酶联免疫法 (ELISA) 是以免疫学反应为基础, 将抗原、抗体的特异性反应与酶对底物的高效催化作用结合起来的一种敏感性很高的检测技术。在这种测定方法中有 3 种必要的试剂: 固相的抗原或抗体, 酶标记的抗原或抗体, 酶作用的底物。夹心法是检测抗原最常用的方法。在测定时, 把鼠神经生长因子 (mNGF) 样品和酶标抗体按不同步骤与固相载体表面抗体起反应, 用洗涤方法使固相载体上形成的抗原抗体复合物与其他物质分开, 最后结合和在固相载体上的酶量与抗体中鼠神经生长因子 (mNGF) 的量成一定的比例。加入酶反应底物后, 底物被酶催化变为有色产物, 产物的量与鼠神经生长因子 (mNGF) 的量直接相关, 故可根据颜色反应的深浅定量分析。

2 材料和设备

2.1 材料 鼠神经生长因子 (mNGF) 标准品, 采用试剂盒自带的鼠神经生长因子 (mNGF) 标准品, 检测鼠神经生长因子 (mNGF) ELISA 试剂盒。

2.2 设备 酶标仪。

3 操作方法

3.1 样品的制备 将鼠神经生长因子 (mNGF) 标准品稀释至 8ng/ml 后, 进行 5 个倍比稀释度稀释, 得到 8、4、2、1、0.5、0.25ng/ml 的标准品溶液。取待测注射用鼠神经生长因子 (mNGF) 成品用 1ml 注射用水溶解完全后稀释至约 2ng/ml 为供试品溶液。

3.2 将鼠神经生长因子 (mNGF) 标准品溶液和供试品溶液以 100 μ l/孔, 分别加入预包被

的羊抗鼠 NGF 多克隆抗体的 96 孔酶标板内,同时以稀释液做空白对照如前操作。4℃放置酶标板过夜后,用洗涤液洗板 4 次,拍干。按试剂盒使用说明书分别加入一抗、二抗,最后加入酶反应底物 100 μ l,室温避光 10~15 分钟。每孔加 100 μ l 终止液终止反应,在 450nm 波长处测定吸光度。

4 结果计算

以鼠神经生长因子(mNGF)标准品溶液吸光度对其相应的浓度作标准曲线,并以供试品溶液吸光度在标准曲线上得到相应的鼠神经生长因子(mNGF)含量。

5 结果判定

标准曲线拟合优度(R^2)大于 0.95;供试品的吸光值在标准曲线线性范围内。

除另有规定外,含量检测结果应符合标示量的 80%~120%。

6 注意事项

6.1 由于是极微量的样品多倍稀释,在操作中吸取样品应仔细、混匀时动作轻柔,尽量不产生气泡并且每步稀释均应更换“枪头”。

6.2 试剂盒中的试剂应放置室温后使用。

6.3 为避免本底干扰应尽力将残留液体清洗干净。

第二法:高效液相色谱法(HPLC)

1 原理

为凝胶色谱柱的分子筛机制。色谱柱多以亲水硅胶、凝胶或经过修饰的凝胶如葡聚糖凝胶(Sephadex)和琼脂糖凝胶(Sepharose)等为填充剂,它们表面分布着不同孔径尺寸的孔,注入的鼠神经生长因子(mNGF)供试品溶液,由相应流动相带入色谱柱内,它们中的不同组分按其分子大小进入相应的孔内并依次被洗脱,同时进入检测器检测,由积分仪或数据处理系统记录和处理色谱信号。

2 材料和设备

2.1 材料

2.1.1 无机盐(分析纯):二水合磷酸二氢钠(0.1mol/L)、十二水合磷酸氢二钠(0.15mol/L)。

2.1.2 有机溶剂(色谱纯):乙腈。

2.1.3 含量对照品:企业自制。

2.2 设备

2.2.1 HPLC 系统:紫外检测器,数据管理系统。

2.2.2 色谱柱:以适合分离分子质量为 5~60kD 蛋白质的色谱用凝胶为填充剂。

2.3 流动相 0.25mol/L 磷酸盐缓冲液(含 0.15mol/L 磷酸氢二钠溶液和 0.1mol/L 磷酸二氢钠溶液)-乙腈(85:15)。

3 操作方法

3.1 样品的制备 取供试品和对照品 1 瓶，用流动相分别稀释，制成每 1ml 中含鼠神经生长因子 (mNGF) 50 μ g 的溶液。

3.2 测定法 采用色谱柱适宜的流速，精密量取 20 μ l 注入液相色谱仪，记录 30 分钟，对照品溶液、供试品溶液均进样 3 次，检测波长 214nm。

4 结果计算

记录色谱图及有关数据，用面积归一化法计算峰面积。按外标法以峰面积计算供试品中 mNGF 的含量。

$$\text{供试品含量} (\mu\text{g/ml}) = \frac{A_s \times W_{RB}}{A_R}$$

式中， A_s 为供试品峰面积， A_R 为对照品峰面积， W_{RB} 为对照品蛋白浓度 ($\mu\text{g/ml}$)。

5 结果判定

鼠神经生长因子 (mNGF) 与人血白蛋白的分离度应符合要求。

除另有规定外，含量检测结果应符合标示量的 80%~120%。

6 注意事项

- 6.1 样品用流动相稀释时尽量溶解完全，必要时采用涡旋仪混匀。
- 6.2 流动相中的磷酸盐缓冲液需经 0.22 μ m 或 0.45 μ m 膜过滤后，再与相应体积的乙腈相混。
- 6.3 每步稀释应更换“枪头”，并注意移液器的使用手法。

起草人：韩春梅 史新昌

复核人：饶春明 周勇

生物学活性测定法

第一法：鸡胚背根神经节法

1 原理

脊神经节 (DRG) 中的神经元表达有较多的 NGF 受体，NGF 可诱导这些神经元长出纤维突起，形成晕圈，依据纤维长出的长度和密度，间接地反映出它的生物学活性。适当浓度的 NGF 可以促进原代培养的鸡胚背根神经节的树突生长。按 50% 最大效应点的稀释倍数可以折算得到待检样品中 NGF 的效价，测定结果需用 NGF 效价测定用对照品校正。

2 材料和设备 (所用试剂均需分析纯或与指定产品相当)

2.1 材料

2.1.1 鼠尾胶：大鼠鼠尾用 75% 乙醇消毒后，分离出尾腱，剪碎，浸泡于 0.1% 冰醋酸溶液中溶解 48 小时，4 $^{\circ}$ C、每分钟 4000 转离心 30 分钟，取上清液，-20 $^{\circ}$ C 保存。

2.1.2 DMEM 培养液: 取 DMEM 培养液, 加入终浓度为 100IU/ml 青霉素、100IU/ml 链霉素和 2mmol/L L-谷氨酰胺, 混匀。

2.1.3 基础培养液: 量取胎牛血清 (FBS) 10ml, 加 DMEM 培养液 90ml, 4℃ 保存。

2.1.4 标准品溶液和供试品溶液的制备: 取鼠神经生长因子生物学活性测定对照品, 用 DNMEM 培养液做 3 倍系列稀释, 共 5~6 个稀释度。取供试品做相同稀释。

2.2 设备 倒置显微镜、专用解剖器具: 一套器械包括两把小解剖镊、两把解剖针、一个接种钩针、一把大镊子、一个大烧杯、小号培养皿若干、若干塑料袋, 均应洁净、干燥和无菌。解剖镜应状态良好。

3 操作方法 (各步操作均应于无菌条件下进行)

前三天

3.1 实验准备 取冻存的鼠尾胶, 融化后加入足够数量的细胞培养瓶, 每瓶 500 μ l, 用平头玻棒均匀涂布于底面的内 1/3 处, 敞口置于洁净工作台中自然干燥 48 小时。之后每瓶加入基础培养液 2ml, 盖上瓶盖, 浸泡 18~24 小时。

第一天

3.2 解剖和接种 将前述 3.1 制备的细胞培养瓶中的培养液倒入灭菌平皿中, 将解剖器具浸入平皿内, 于解剖镜下摘取鸡胚的背根神经节。接种于 3.1 制备的细胞培养瓶中, 每瓶接种 3~5 个神经节, 37℃ 条件下保温 2 小时。

摘取鸡胚背根神经节手术术式: 取鸡胚一个, 置于掌心, 往上翘的一端为鸡胚所在处。左手将该端朝上握持, 右手用大镊子围绕这一端轻轻敲击一圈, 拨去蛋壳。用小镊子轻轻夹住鸡胚的黑色头部, 将鸡胚从蛋壳中取出, 置于解剖镜下装有适量生理盐水的培养皿里。将鸡胚的腹部朝上, 四肢伸展, 去除头部及尾部, 夹断胸部血管。调节解剖镜的焦距、光圈及目镜, 至能看清鸡胚内部结构。用两把小解剖针去掉覆盖在脊柱上面及侧面的肌肉和腹膜, 暴露出脊柱两侧侧后方的神经节。每个神经节与一细丝轴突相连, 似蝌蚪状, 靠近尾部的最下方三个神经节即为要摘取的背根神经节。双手持两解剖针同时操作, 一手持解剖针夹断脊柱与神经节相连处, 另一手持解剖针夹住细丝将神经节往外迁移, 夹断细丝, 摘取神经节并转移至另一解剖针上。将摘取的神经节转移到接种钩针上, 用接种钩针轻轻接种到准备好的细胞培养瓶中。

3.3 制备样品梯度 鼠神经生长因子 (mNGF) 供试品和标准品用 DMEM 培养液作 3 倍梯度稀释, 每个样品作 5 至 6 个稀释度 (应稀释至实验出现阴性结果)。依次加入相应标记的细胞培养瓶中, 同时设空白对照。于 37℃、含 5% 二氧化碳、饱和湿度的培养箱中培养 24 小时后观察。

4 观察

用倒置显微镜下观察神经节轴突生长情况, 未见神经节生长者为阴性, 以“-”表示; 神经节突起但生长较稀疏以“+”表示; 明显生长以“++”表示; 生长较好以“+++”表示; 生长最好以“++++”表示; 出现过量抑制以“#”表示。

5 结果计算

以神经节生长最好者出现在从阴性结果的稀释度开始往回数第 3 至第 4 稀释度中, 从这两个稀释度中取生长最好者作为判定终点计算样品和标准品的实测活性, 如果两个稀释度长得同样好, 则取两者的平均值。

$$\text{供试品的活性单位 (U/ml)} = \text{标准品生物学活性} \times \frac{\text{供试品终点稀释倍数}}{\text{标准品终点稀释倍数}}$$

样品的实测活性 = 样品的预稀释倍数 × 样品对应于标准品神经节生长最好的倍比稀释点处的实测活性

6 结果判定

出现“++++”的稀释度为终点，并按标准品“++++”位置校正实验结果。除另有规定外，生物学活性检验结果应不低于标示量的 80%。

7 注意事项

7.1 摘取神经节时，解剖针往外迁移的动作要缓慢，避免将结缔组织撕扯下来。

7.2 为保证实验结果的准确性和排除稀释过程中残留的干扰，应在每一步稀释过程中更换“枪头”并规范移液器的使用手法。

〔附注〕神经节轴突生长判定标准

“#”：神经节生长过量抑制。“++++”：神经节突起长满四周，又长又密，呈树杈状。“+++”：神经节突起长满 2/3 周，呈树杈状。“++”：神经节突起长满 1/2 周。“+”：神经节突起只有几根。“-”：无突起生长。



“-”



“+”



“++”



“+++”



“++++”



“#”

第二法：TF-1 细胞/MTS 比色法

1 原理

TF-1 细胞是一种人红系白血病细胞，其细胞表面表达有神经生长因子（NGF）高亲和力的受体 TrKA，神经生长因子（NGF）能够与其结合，并通过剂量依赖关系诱导和促进 TF-1 细胞增值。本法依据 TF-1 细胞的生长状况因鼠神经生长因子（mNGF）生物学活性的不同而不同，根据客观读数，通过四参数方程计算鼠神经生长因子（mNGF）的生物学活性。本方法为仲裁法。

2 材料和设备（所用试剂均需分析纯或与指定产品相当）

2.1 材料

2.1.1 RPMI 1640 培养液：取市售 RPMI160 培养液，加入终浓度为 100IU/ml 青霉素和 100IU/ml 链霉素。

2.1.2 基础培养液：量取胎牛血清（FBS）100ml，加入 RPMI 1640 培养液 900ml 中。4℃ 保存。

2.1.3 完全培养液：基础培养液加鼠神经生长因子（mNGF）至终浓度为每 1ml 含 12U。

2.1.4 MTS 溶液：取市售 MTS 于 4℃ 融化，1.2ml/支分装到 EP 管中，并避光保存于 -20℃。

2.1.5 TF-1 细胞：TF-1 细胞株用完全培养液于 37℃、5%二氧化碳培养箱中培养，控制细胞浓度为每 1ml 含 $1.0 \times 10^5 \sim 5.0 \times 10^5$ 个细胞，传代后 24 小时用于 NGF 生物学活性测定。

2.1.6 标准品：神经生长因子（NGF）生物学活性测定对照品。

2.2 设备 净化工作台、倒置显微镜、二氧化碳培养箱、普通冰箱、低温冰箱、液氮罐、取液器、普通离心机、多功能酶标仪。

3 操作方法（3.1~3.7 各步骤应于洁净条件下进行）

第一天

3.1 实验准备 取适量 Eppendorf 管、96 孔细胞培养板等做相应标记。将实验所用溶液预温至 37℃。

3.2 制备细胞悬液 取足量 TF-1 细胞培养物 1000 转/分钟离心 5 分钟，弃去上清，收集 TF-1 细胞。加入 10ml RPMI-1640 培养液 1000 转/分钟离心 5 分钟后弃去上清，如此洗 2 次后重悬于基础培养液配成每 1ml 含 5.0×10^4 个细胞的细胞悬液，置于 37℃、5%二氧化碳条件下备用。

3.3 制备标准品溶液 取神经生长因子（NGF）生物学活性测定的标准品，按说明书复溶后，用基础培养液稀释至每 1ml 含 100U 或适宜浓度（每步稀释不超过 10 倍）。在 96 孔细胞培养板中做 3 倍系列稀释，共 8 个稀释度，每个稀释度做 2 孔，每孔分别留 100 μ l 标准品溶液，弃去孔中多余溶液。以上操作在洁净条件下进行。

3.4 制备供试品溶液 将供试品按标示量复溶后，用基础培养液预稀释成每 1ml 约含 100U（每步稀释不超过 10 倍）。在 96 孔细胞培养板中做 3 倍系列稀释，共 8 个稀释度，每个稀释度做 2 孔，每孔分别留 100 μ l 供试品溶液，弃去孔中多余溶液。以上操作在洁净条件下进行。

3.5 制备样本梯度 在 96 孔细胞培养板中，第 1~11 列每孔加入 100 μ l 基础培养液，第

12 列每孔加入 100 μ l 完全培养液。在 A6、A7 各孔中每孔加入 100 μ l 标准品溶液，在 A2、A3；A4、A5；A8、A9；A10、A11 各孔中每孔加入 100 μ l 供试品溶液，自 A 行至 H 行进行 3 倍系列稀释，共 8 个稀释度，每个稀释度做 2 个孔，每孔分别留 100 μ l 溶液，弃去孔中多余溶液。

3.6 加入细胞悬液并培养 向加有标准品溶液和供试品溶液的 96 孔细胞培养板中加入细胞悬液，每孔 100 μ l，于 37 $^{\circ}$ C、5%二氧化碳条件下培养 66~72 小时。

第三天

3.7 加入 MTS 溶液并培养 每孔加入 MTS 溶液 20 μ l，于 37 $^{\circ}$ C、5%二氧化碳条件下培养 3 小时。以上操作在无菌条件下进行。

3.8 测定结果 放入酶标仪，以 550nm 为参比波长，于波长 490nm 处测定吸光度，记录测定结果。

4 结果计算

试验数据采用计算机程序或四参数回归算法进行处理，并按下式计算结果：

$$\text{供试品生物学活性 (U/ml)} = P_r \times \frac{D_s \times E_s}{D_r \times E_r}$$

式中 P_r 为标准品生物学活性，U/ml； D_s 为供试品预稀释倍数； D_r 为标准品预稀释倍数； E_s 为供试品相当于标准品半效量的稀释倍数； E_r 为标准品半效量的稀释倍数。

5 结果判定

标准品拟合线性 R^2 应不低于 0.90，标准品稀释度中的最大（或最小）吸光值与供试品稀释度中的最大（或最小）吸光值之间应无统计学差异；标准品四参数曲线和供试品四参数曲线的曲线斜率应无统计学差异（即曲线平行）；标准品和供试品的半效稀释度之比应在 0.5~2.0 之间；标准品各稀释度中极值差应具有统计学差异，供试品同理。

除另有规定外，生物学活性检验结果应不低于标示量的 80%。

6 注意事项

本方法需要无菌保障体系和无菌操作；为保证实验结果的准确性和排除稀释过程中残留的干扰应在每一步稀释过程中更换“枪头”，并规范移液器的使用手法；在标准品和供试品的稀释过程和细胞悬液的制备过程中充分混匀非常重要；由于完全培养基中含有一定量的鼠神经生长因子（mNGF），在制备检测细胞时需要尽力清洗去除细胞周围的鼠神经生长因子（mNGF），但清洗的时间不宜过长，因为 TF-1 细胞长时间失去鼠神经生长因子（mNGF）将转入不可逆的凋亡状态。推荐条件：每分钟约 1000 转，离心 5 分钟，清洗次数不超过 3 次，总时长不超过 1 小时。如果需要对供试品进行标定，建议增加检测重复次数至 6 次，然后取平均值。

起草人：韩春梅 史新昌

复核人：饶春明 周勇

外源病毒污染检查法

1 原理

BHK-21 细胞即仓鼠肾细胞，原始的细胞株是成纤维细胞，贴壁生长，广泛用于增殖各种病毒，细胞稳定性好，被病毒感染后可出现细胞病变。鼠神经生长因子（mNGF）提取自鼠颌下腺，有可能存在鼠源病毒污染的风险，虽然生产过程含有病毒灭活工艺，为安全起见，还需进行最终产品病毒检测。将制品加入正常培养物中，对污染的活病毒进行扩增，且鼠神经生长因子不具有杀伤 BHK-21 细胞作用，一般连续盲传 3 次。培养完成后观察病毒对细胞的致病变效应，判断产品是否受到病毒的污染。

2 材料和设备

2.1 材料

2.1.1 BHK-21 细胞：代次小于 70 代。

2.1.2 MEM（minimum Eagle's medium）培养基：市售。

2.1.3 胎牛血清：市售。

2.2 设备 倒置显微镜、超净工作台、二氧化碳细胞培养箱。

3 操作方法

3.1 取状态良好的 BHK-21 细胞 1.0×10^5 个接种于 25cm^2 细胞方瓶里，加入 MEM 培养液+3%胎牛血清共 7ml，于 37°C 、5%二氧化碳条件下培养 24 小时，使其充分贴壁生长。

3.2 取供试品 1 支，用 MEM 培养液 1ml 复溶，取 1ml 加入到培养了 24 小时的 BHK-21 细胞中， 37°C 、5%二氧化碳条件下培养 7 天。同时用 MEM 培养液 1ml 做阴性对照。

3.3 培养 7 天后，观察细胞状态，反复冻融细胞 3 次（ -80°C 冻 1 小时， 37°C 融 0.5 小时），每分钟 1000 转离心 5 分钟，收集上清液。

3.4 取状态良好的 BHK-21 细胞 1.0×10^5 个接种于 25cm^2 细胞方瓶里，加入 MEM 培养液+3%胎牛血清共 7ml，于 37°C 、5%二氧化碳条件下培养 24 小时，使其充分贴壁生长。24 小时后吸弃培养液 5ml，加入前述 3.3 中收集的上清 5ml， 37°C 、5%二氧化碳条件下培养 7 天。

3.5 培养 7 天后，观察细胞状态。重复前述 3.3、3.4 一次。培养过程中根据细胞状态酌情补液（MEM 培养液+3%胎牛血清）。

3.6 培养 7 天后，观察细胞状态。

4 结果判定

对照组细胞有 80% 存活率，则实验成立。

实验组细胞经三代盲传后，生长状态良好，无病毒感染引起的细胞病变，判为合格。

5 注意事项

5.1 培养液在使用前需 37°C 预热或在室温平衡后再使用。

5.2 细胞培养过程中吸取过培养液的吸头不能再用火焰烧灼，防止残留在吸头内的培养液焦化，将有害物质带入培养液中。

- 5.3 尽量缩短各种液体、细胞的暴露时间。
- 5.4 避免液体之间、细胞之间的交叉污染。
- 5.5 培养液的配制量，以最好在 2 周内用完为宜。

起草人：秦玺 范文红 史新昌

复核人：饶春明 周勇

人血白蛋白

简 述

人血白蛋白是血浆中含量最高的蛋白质，等电点为 5.9，分子量为 69kD，由 609 个氨基酸组成的单链蛋白。人血白蛋白在临床上有着重要的应用价值，药理作用为增加血容量和维持血浆胶体渗透压，运输小分子物质及解毒、营养供给，调节组织与血管之间的水分动态平衡。人血白蛋白临床通常用于创伤失血、烧伤引起的休克；脑水肿及损伤引起的颅内压升高；肝硬化及肾病引起的水肿或腹水；低蛋白血症的防治；新生儿高胆红素血症；用于心肺分流术、烧伤、血液透析的辅助治疗和成人呼吸窘迫综合征等。

人血白蛋白检定应依据现行版《中国药典》或其他国家药品标准进行测定，并应符合相关要求。

人血白蛋白的检定内容按照生产阶段分为原液、半成品、成品。其中，原液检定主要包括蛋白质含量测定、纯度、pH 值、残留乙醇含量等；半成品检定主要包括无菌检查、热原检查等；成品检定，按照检验类别一般分为鉴别试验，主要包括免疫双扩散、免疫电泳法；物理检查主要包括外观、可见异物、不溶性微粒检查、渗透压摩尔浓度、装量、热稳定性试验；化学检定主要包括 pH 值、蛋白质含量、纯度、钠离子含量、钾离子含量、吸光度、多聚体含量、辛酸钠含量、乙酰色氨酸含量、铝残留量、激肽释放酶原激活剂（PKA）含量、HBsAg、无菌检查、异常毒性检查、热原检查等。依据生产工艺的不同，对于一些其他辅料例如乙酰色氨酸等也需要进行检测并控制其添加范围。对于人血白蛋白产品，其关键质量参数主要包括但不限于蛋白质含量、多聚体含量、纯度、激肽释放酶原激活剂（PKA）含量以及安全性指标例如无菌检查、异常毒性和热原检查等。

鉴别试验

1 原理

根据抗原抗体反应生成免疫复合物的原理，用免疫双扩散方法，对人血制品进行鉴别试验分析。

2 材料和设备

2.1 琼脂糖 进口分装。称取适量，加 0.9%氯化钠溶液使终浓度为 1.5%。

2.2 抗体 冻干的抗人、抗牛、抗马，抗羊、抗猪血浆，按说明书要求溶解备用。

2.3 阳性对照 正常人血浆、正常牛血浆、正常马血浆、正常羊血浆、正常猪血浆。

2.4 0.5%氨基黑染色剂 取氨基黑 10B 0.5g，溶于 50ml 甲醇、10ml 冰醋酸及 40ml 蒸馏水的混合液中。

2.5 漂洗液 取 45ml 乙醇、5ml 冰醋酸和 50ml 蒸馏水混合均匀。

2.6 试验用具 水平台、玻板、打孔器（直径为 3mm）、湿盒、孵箱等。

3 操作方法

3.1 供试品稀释 用 0.9%氯化钠溶液将样品进行适量稀释。

3.2 制板 将凝固的 1.5%琼脂糖加热融化，在不低于 60℃时按 0.19ml/cm²的比例倒在水平台板上，放冷凝固待用。

3.3 打孔 用直径 3mm 打孔器，打孔，孔距 3mm。

3.4 加样 中央孔分别加入各种抗血清，周边孔加入各待测样品，并留一孔加入相应阳性对照血浆。每孔加样 20μl。然后置于湿盒中，37℃水平扩散 24 小时。

3.5 制片保存

3.5.1 浸泡：用 0.9%氯化钠溶液浸泡琼脂板，至少 5 天，期间要勤换 0.9%氯化钠溶液。

3.5.2 染色：将浸泡好的琼脂板放入氨基黑溶液中，染色 3 分钟。

3.5.3 脱色：用洗脱液脱色，期间要勤换洗脱液，直至琼脂板蓝色底色脱去，沉淀线呈清晰蓝色为止。

3.5.4 干燥：用透明玻璃纸将琼脂板包好，外再用滤纸包好，用一稍重底面平滑物压置 3~4 天。琼脂成一干燥薄片即可。

4 结果与判定

各阳性对照应成立，人血制品只与抗人血清之间产生沉淀线、而不与其他动物血清之间产生沉淀线者，判为合格。

5 注意事项

抗原和抗体在合适比例的蛋白浓度情况下才能产生清晰的沉淀线。若实验结果发现沉淀线不清晰，则需重新调整抗原或抗体的稀释度进行重试。

起草人：郝杰 王威

复核人：侯继锋 王菁舟

人血白蛋白吸光度测定法

1 原理

采用 403nm 吸光度对血色素进行测定。通常将供试品稀释至 10g/L 时，403nm 下测得的吸光度不高于 0.15。

2 材料和设备

紫外分光光度计、径长 1cm 的吸收池、比色皿、0.9%氯化钠溶液。

3 操作方法

按紫外分光光度计仪器使用说明进行开机和软件通讯链接，供试品按标示蛋白浓度，以 0.9%氯化钠溶液稀释至 10g/L，混匀后备检。以超纯水或 0.9%氯化钠溶液作为空白进行调零，读

取 403nm 下供试品吸光度值。

4 计算与结果判定

直接以 403nm 下供试品吸光度值作为判定依据，通常应不高于 0.15。

5 注意事项

供试品应混匀后备检。

起草人：王敏力 赵卉
复核人：侯继锋 王菁舟

钠离子测定法

1 原理

人血浆中主要的阳离子是钠离子，浓度大约为 140mmol/L。钠离子是保持细胞外液容量与渗透压的主要阳离子。钠离子对神经肌肉兴奋性的维持也十分重要。因此在一些血液制品中需要进行钠离子含量控制。2015 年版《中国药典》中其限量规定为不大于 160mmol/L。血液制品钠离子含量的测定在 2015 年版《中国药典》中是基于火焰光度法来检测的。火焰光度法是以火焰作为激发光源，含钠离子供试品溶液用喷雾装置以气溶胶形式引入火焰光源中，靠火焰光的热能将钠元素原子化并激发其发射特征光谱，通过光电检测系统测量出元素特征谱线的辐射光强度，从而进行元素分析的方法。通常比较钠离子对照品溶液和供试品溶液的发光强度，求得供试品中钠离子的含量。

2 材料和设备

- 2.1 材料 50ml 量瓶，100ml 量瓶，氯化钠标准液。
- 2.2 仪器设备 火焰光度计。

3 操作方法

- 3.1 打开燃料气瓶阀门和空气压缩机（空气压缩机压力可控制在 0.12~0.2MPa），点火，通过观察孔确保燃气燃烧火焰呈蓝色。预热仪器 30 分钟，用蒸馏水充分洗涤。
- 3.2 钠离子标准曲线绘制 精密称取于 110℃ 干燥至恒重的氯化钠 0.293g，置 100ml 量瓶中，用水稀释至刻度，再精密量取该溶液 0.9ml、1.1ml、1.3ml、1.5ml、1.7ml，分别置 50ml 量瓶中，用水稀释至刻度，制成 0.9mmol/L、1.1mmol/L、1.3mmol/L、1.5mmol/L、1.7mmol/L 的系列标准钠溶液。
- 3.3 供试品稀释 将样品平衡到室温，溶解，预估钠离子含量，精密量取适量，置 50ml 量瓶中，用水稀释至刻度，即为供试品溶液。
- 3.4 供试品测定 按火焰光度计使用说明进行，在波长 589nm 处测定标准钠溶液的发光强度。基本分以下几个步骤。
 - 3.4.1 通道的选定：选定所要测定的离子，该离子通道指示灯亮。
 - 3.4.2 仪器校准：调零，设定最高浓度标准液。

3.4.3 标准溶液测定：依次导入标准品溶液，浓度由小到大，记录读数。

3.4.4 测得每个标准溶液的 OD 值，以系列标准钠溶液的浓度对其相应的发光强度作直线回归。

3.4.5 标准品和供试品测定：标准品和供试品逐个进行测定，代入直线回归方程求出每个样品钠离子含量。

3.5 关机 测定结束用蒸馏水清洗进样管道 5 分钟然后关机。关机顺序一般为：燃气阀开关→仪器电源→空压机电源。

4 计算

供试品钠离子含量 (mmol/L) = 钠离子测定浓度 × 稀释倍数

5 结果与判定

标准曲线直线回归相关系数应不低于 0.99。钠离子含量应该满足标准要求。

6 注意事项

6.1 供试品前处理如使用硝酸、硫酸等试剂应采用高纯试剂。

6.2 配制实验用各种试剂水应为经超纯水仪制备的去离子水（电阻率应不小于 $18\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$ ）。以减少实验中钾、钠、镁、铁等元素污染。

6.3 测定室内应保持清洁，通风良好，禁止使用明火。

6.4 应定期清洁雾化器，清除气路内积水，保持气路畅通。

6.5 保持电压稳定，助燃气流恒定，火焰稳定，防止引起死机。

6.6 定期对火焰光度计仪器进行检定和校正。

起草人：管利东 赵卉

复核人：侯继锋 王菁舟

钾离子测定法

1 原理

钾离子是人血浆中重要的阳离子。血清钾的正常值为 $3.5\sim 5.5\text{mmol/L}$ 。钾在人体内的主要作用是维持酸碱平衡，参与能量代谢以及维持神经肌肉的正常功能。血清钾浓度过高 ($>7\text{mmol/L}$) 会造成心肌细胞兴奋降低，甚至会造成心跳停止。因此产品工艺中涉及到钾离子且临床使用输注用量大的血液制品需做钾离子测定。血液制品钾离子测定在 2015 年版《中国药典》中是基于火焰光度法来检测的。火焰光度法是以火焰作为激发光源，含钾离子供试品溶液用喷雾装置以气溶胶形式引入火焰光源中，靠火焰光的热能将钾元素原子化并激发其发射特征光谱，通过光电检测系统测量出元素特征谱线的辐射光强度，从而进行元素分析的方法。通常比较钾离子对照品溶液和供试品溶液的发光强度，求得供试品中钾离子的含量。所用仪器为火焰光度计，由燃烧系统、单色器和检测系统等部件组成。燃烧系统由喷雾装置、燃烧灯、燃料气体和助燃气体的供应等部分组成。燃烧火焰通常是用空气作助燃气，用煤气或液化石油气等作燃料气组成的火焰，即空气-煤气或空气-液化石油气火焰。仪器某些工作条件（如火焰类型、

火焰状态、空气压缩机供应压力等)的变化可影响灵敏度、稳定程度和干扰情况,应按各品种项下的规定选用。

2 材料和设备

2.1 材料 50ml 量瓶, 500ml 量瓶, 氯化钾标准液。

2.2 仪器设备 火焰光度计。

3 操作方法

3.1 打开燃料气瓶阀门和空气压缩机(空气压缩机压力可控制在 0.12~0.2MPa), 点火, 通过观察孔确保燃气燃烧火焰呈蓝色。预热仪器 30 分钟, 用蒸馏水充分洗涤。

3.2 钾离子标准曲线绘制 精密称取于 110℃ 干燥至恒重的氯化钾 56.0mg, 置 500ml 量瓶中, 用水溶解并稀释至刻度, 再精密量取该溶液 1.0ml、2.0ml、3.0ml、4.0ml、5.0ml, 分别置 50ml 量瓶中, 用水稀释至刻度, 制成 0.03mmol/L、0.06mmol/L、0.09mmol/L、0.12mmol/L、0.15mmol/L 的系列标准钾溶液。

3.3 供试品稀释 将供试品平衡到室温, 溶解, 预估钾离子含量, 精密量取适量, 置 50ml 量瓶中, 用水稀释至刻度, 即为供试品溶液。

3.4 供试品测定 按火焰光度计使用说明进行, 在波长 769nm 处测定标准钾溶液的发光强度。基本分以下几个步骤。

3.4.1 通道的选定: 选定所要测定的离子, 该离子通道指示灯亮。

3.4.2 仪器校准: 调零, 设定最高浓度标准液。

3.4.3 标准溶液测定: 依次导入标准品溶液, 浓度由小到大, 记录读数。

3.4.4 测得每个标准溶液的 OD 值, 以系列标准钾溶液的浓度对其相应的发光强度作直线回归。

3.4.5 标准品和供试品测定: 标准品和供试品逐个进行测定, 代入直线回归方程求出每个样品钾离子含量。

3.5 关机 测定结束用蒸馏水清洗进样管道 5 分钟然后关机。关机顺序一般为: 燃气阀开关→仪器电源→空压机电源。

4 计算

$$\text{供试品钾离子含量 (mmol/L)} = \text{钾离子测定浓度} \times \text{稀释倍数}$$

5 结果与判定

标准曲线直线回归相关系数应不低于 0.99。钾离子含量应该满足标准要求。

6 注意事项

6.1 供试品前处理如使用硝酸、硫酸等试剂应采用高纯试剂。

6.2 配制实验用各种试剂水应为经超纯水仪制备的去离子水(电阻率应不小于 18MΩ·cm)。以减少实验中钾、钠、镁、铁等元素污染。

6.3 测定室内应保持清洁, 通风良好, 禁止使用明火。

6.4 应定期清洁雾化器, 清除气路内积水, 保持气路畅通。

- 6.5 保持电压稳定, 助燃气流恒定, 火焰稳定, 防止引起死机。
- 6.6 定期对火焰光度计仪器进行检定和校正。

起草人: 管利东 赵卉
复核人: 侯继锋 王菁舟

辛酸钠测定法

1 原理

为防止在贮存期间蛋白质变性, 制品中可加入适量稳定剂。加入的稳定剂对制品无有害作用, 并且对人体不会造成任何不良反应。加入适量的辛酸钠, 在研发阶段验证制品的稳定性, 确定制品适宜的贮存和运输条件和有效期。辛酸钠有很多生物学作用, 如引起低血糖症, 对各类动物有麻醉作用, 增加氧的消耗, 降低肝脏对长链脂肪酸的清除作用, 血管舒张作用, 降低肌肉收缩力, 改变上皮细胞和膜的渗透压, 抑制血小板活性, 增加从胰腺细胞释放胰岛素和酶, 改变碳水化合物代谢, 降低氨基酸结合到蛋白质中, 降低氨的生成和代谢以及抑制 DNA 和 RNA 的合成等, 因此, 一旦加入的辛酸钠的量足以保证蛋白质在 60℃ 加热 10 小时的稳定性, 就不再增加它的量。本法系用气相色谱法测定供试品中辛酸钠含量。

2 试剂和设备

- 2.1 试剂 三氯甲烷、辛酸标准液、庚酸内标液、1.5mol/L 高氯酸。
- 2.2 设备 气相色谱仪、色谱柱、振荡器、离心机。

3 操作方法

3.1 色谱条件与系统适用性试验 用酸改性聚乙二醇(20M)毛细管色谱柱, 柱温 160℃, 火焰离子化检测器, 检测温度 230℃, 气化室温度 230℃, 载气(氮气)流速为每分钟 35ml。辛酸峰与庚酸峰的分离度应大于 1.5, 辛酸峰的拖尾因子应为 0.95~1.20, 辛酸对照品溶液连续进样 5 次, 所得辛酸峰与庚酸峰面积之比的相对标准偏差(RSD)应不大于 5%。

3.2 取庚酸, 加三氯甲烷制成每 1ml 中含 10mg 的溶液, 即得。

3.3 标准曲线的绘制 辛酸标准液与庚酸内标液组成 5 个标准管, 混合均匀后, 加三氯甲烷至 4ml, 在通风橱中将三氯甲烷挥发至干, 然后定量加入 0.1ml 三氯甲烷溶解残渣, 上机测定。

3.4 供试品测定步骤 取供试品用水准确稀释成每升含蛋白质 40~50g 的溶液, 精密量取供试品溶液 0.5ml, 加庚酸内标液 30μl, 1.5mol/L 高氯酸 0.2ml, 在振荡器上混合 1 分钟, 加 4ml 三氯甲烷, 加盖, 用振荡器剧烈混合 2 分钟, 3800 转/分钟离心 20 分钟吸去上层水相, 小心将三氯甲烷层倾入 10ml 试管中, 在通风橱内将溶剂挥发干, 加 0.1ml 三氯甲烷溶解残渣, 上机测定。

4 计算

辛酸钠含量 (mmol/g 蛋白) = 辛酸量 (μg) × 稀释倍数 / (取样量 (ml) × 1000 × 144.22 × 蛋白含量 (g/ml))

式中,辛酸量 (mmol) 等于辛酸钠量 (mmol), 辛酸分子量为 144.22。

5 注意事项

- 5.1 标准及供试品中有机溶剂挥发速度应尽可能一致。
- 5.2 标准直接配制无需加入沉淀剂。
- 5.3 按《中国药典》要求进行系统适用性测定。

起草人: 周倩 马秋平

复核人: 侯继锋 王箬舟

人血白蛋白多聚体含量测定法 (HPLC 法)

1 原理

人血白蛋白多聚体对产品有效性和安全性均有影响。多聚体增多将降低胶体渗透压并加速被排除体外, 失去人血白蛋白的血容扩张作用并可能导致脂肪酸结合能力下降, 因此需要对多聚体含量进行控制。

利用高效液相分子排阻方法分析人血白蛋白多聚体含量, 色谱图中全排阻峰为多聚体峰, 按面积归一化法计算多聚体含量并除以 2, 即为多聚体含量。

2 材料和设备

2.1 高压液相系统 高压液相、高压液相色谱柱、紫外检测器、色谱管理系统。

2.2 流动相处理系统 过滤器, 过滤泵。

2.3 样品过滤膜 水溶性 $0.45\mu\text{m}$ (直径 13mm)。

2.4 PALL 小型超纯水制造器。

2.5 溶液配制

2.5.1 贮存液 A: 0.5mol/L 磷酸二氢钠 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) pH4, 称取 39g 磷酸二氢钠, 用超纯水溶解并稀释至 500ml。

2.5.2 贮存液 B: 0.5mol/L 磷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$), 称取 179.1g, 用超纯水溶解并稀释至 1000ml。

2.5.3 工作液 C: pH7、 0.2mol/L 磷酸盐缓冲液、1%异丙醇。

准确量取: 200ml 贮存液 A、420ml 贮存液 B、914.5ml 超纯水、15.5ml 异丙醇。混匀后用 $0.45\mu\text{m}$ 水溶性膜过滤备用。

2.5.4 0.05%叠氮钠: 称 0.5g 叠氮钠溶于 1000ml 超纯水中, 用 $0.45\mu\text{m}$ 水溶性膜过滤并超声脱气。

2.5.5 供试品的制备 用流动相将人血白蛋白稀释至 12mg/ml 蛋白溶液, 用 $0.45\mu\text{m}$ 水溶性膜过滤, 备用。

2.5.6 试验参数

高压液相泵流速 (分离样品): 0.6ml/min 。

每个供试品收集数据时间: 60 分钟。

供试品上柱浓度及体积: $20\mu\text{l}$ (12mg/ml)。

室温：20~30℃。

3 操作方法

3.1 新柱子的使用(或保存的柱子的重新使用):首先用超纯水以 0.2ml/min 流速流洗过夜,然后用 1%异丙醇以 0.2ml/min 流速流洗过夜。

3.2 加样、洗脱、色谱图记录、色谱柱的处理:

3.2.1 HPLC 系统平衡:用工作液 C 以 0.6ml/min 流速平衡 HPLC 系统(约需 2 小时)至基线平稳。

3.2.2 加样:12mg/ml 样品,加样 20 μ l。

3.2.3 洗脱、记录:用工作液 C 以 0.6ml/min 流速洗脱,同时用高压液相系统的色谱管理系统记录色谱图,收集有关数据。

3.2.4 柱的处理及保存:

3.2.4.1 过夜:色谱柱工作一天后需用 1%异丙醇以 0.2ml/min 流速流洗过夜备用。

3.2.4.2 长期保存:色谱柱如长期不用,HPLC 柱在用 1%异丙醇、再用超纯水以 0.4ml/min 流速流洗 2 小时,最后用 0.05%叠氮钠以 0.4ml/min 流速至少流洗 2 小时,之后取下色谱柱。保存在温度相对稳定的地方。防止长菌及冰冻。

4 计算

用 HPLC 提供的色谱管理系统对实验结果进行数据处理:

$$\text{人血白蛋白多聚体含量\%} = \text{相对面积百分比含量} - 2$$

5 结果判定

人血白蛋白多聚体与二聚体峰分离度应满足现行版《中国药典》相关要求。

6 注意事项

6.1 关于液体流动相 配制液体流动相所用的试剂至少应是分析纯的,所使用的水为超纯水,流动相配好后应用 0.45 μ m 水溶性膜过滤并超声脱气。流动相 C 及 1%异丙醇配好后只能用一周。贮存液 A 需新鲜配制。贮存液 B 只能用一周。注意防止流动相长菌及其他污染。

6.2 供试品的处理 样品应新鲜配制,注意防止长菌。

起草人:王敏力 赵卉

复核人:侯继锋 王菁舟

乙酰色氨酸含量测定法

1 原理

乙酰色氨酸是人血白蛋白生产过程中添加的一种稳定剂,按照相关要求应对其含量进行定量测定。通常采用的方法为紫外-可见分光光度法(吸收系数法)。

2 材料和设备

- 2.1 紫外分光光度计。
- 2.1 离心机。
- 2.3 石英比色皿（1cm）。
- 2.4 高氯酸（A.R）（0.3mol/L）（室温下可保存6个月）。

3 操作方法

- 3.1 依据供试品蛋白浓度，以0.9%氯化钠溶液将供试品稀释至50g/L，混匀备检。
- 3.2 按下表制备空白对照和供试品待测液。混匀后室温条件下放置10分钟，每分钟3500转离心20分钟。用空白溶液调零点，280nm波长测定上清液的吸光度值（ A_{280} ）。

	空白	供试品
供试品溶液（ml）	/	0.1
0.9%氯化钠溶液（ml）	0.4	0.3
0.3mol/L 高氯酸（ml）	3.6	3.6

4 计算

$$\text{供试品乙酰色氨酸含量 (mmol/g)} = (A_{280} \times D \div 5.25) \div \text{Pr (g/L)}$$

式中，D为供试品的稀释系数（5%:40；20%:160；25%:200），5.25为乙酰色氨酸的摩尔吸收系数，Pr（g/L）为供试品的蛋白质含量。

5 注意事项

离心应充分和彻底，防止蛋白干扰。

起草人：王敏力 赵卉
复核人：侯继锋 王菁舟

人血白蛋白铝残留量测定法

1 原理

在某些病理状态下，如肾病患者和肾发育不全的新生儿，摄入过量的铝会造成铝在人体内的残留。铝相关疾病主要特征是有缺陷的矿化和骨质软化，这是由于在类骨质矿化位铝过度沉积造成的。铝也直接影响造血功能，过量铝诱导贫血。因此制品中铝的残留量直接关系到白蛋白使用的安全性，特别是对肾病患者和肾发育不全的新生儿尤为重要。

人血白蛋白中铝离子主要来源于蛋白分离过程中压滤法使用的助滤剂（如硅藻土）及最终盛装制品的玻璃容器。采用原子吸收分光光度法测定铝残留量。由铝灯发出的特征谱线通过供试品经原子化产生的原子蒸气时，被蒸气中铝的基态原子所吸收，通过测定辐射光强度减弱程

度,采用标准加入法,求出供试品中铝含量。

2 材料和设备

铝标准物质、原子吸收分光光度计。

3 操作方法

3.1 原子吸收分光光度计参数设定 波长(309.3nm),狭缝(0.5mm)。

3.2 加样量(20 μ l)。

3.3 方法:标准加入法测定峰高。

3.4 将供试品液稀到合适浓度,再将空白溶液、供试品溶液和标准铝溶液(100 μ g/L)分别放入自动加样器的相应位置上,仪器自动按表1和表2设置的条件测试,并计算出最终结果。

表1 空白对照、供试品及混合溶液的制备

	最终浓度	空白	标准液(100 μ g/L)	供试品
供试品(μ l)	—	10	—	10
空白(μ l)	—	20	—	—
标准液(μ l)	30.0 μ g/L	4	6	10

表2 炉温控制程序

程序	步骤	温度($^{\circ}$ C)	时间(Ramp+Hold)(秒)	通气
1	加样	室温	—	None
2	预热	40	0.1+0.1	None
3	干燥	90	90+1	Inet
4	干燥	102	90+1	Inet
5	灰烬	700	5+1	Both
6	灰烬	1200	5+20	Both
7	灰烬	1200	0+0.5	None
8	原子化	2600	1+2	None
9	清除	2650	0.1+2	Both

4 计算

将供试品稀释倍数输入电脑,软件自动计算出最终铝残留量结果(μ g/L)。

5 结果与判定

按照2015年版《中国药典》三部要求,人血白蛋白中的铝残留量 \leq 200 μ g/L。

6 注意事项

- 6.1 供试品和标准品取量、样品稀释倍数及控制程序可根据方法验证情况作适当调整。
- 6.2 尽量避免使用玻璃容器。

起草人：马秋平 管利东

复核人：侯继锋 王菁舟

激肽释放酶原激活剂（PKA）含量测定法

1 原理

血浆激肽释放酶原也称前激肽释放酶，它可以被激肽释放酶原激活剂激活成具有蛋白水解活性的激肽，参与炎症反应、超敏反应、免疫复合反应、器官移植的排斥反应等一系列的生理病理过程，能激发激肽系统的激活剂以及其中间产物均有降压作用。PKA 会引起血管舒张，血压下降。特别是当白蛋白作为血浆扩张剂用于血容量不足的患者时，这种不良反应会使患者的病情恶化。接受血管紧张素转化酶抑制剂治疗患者对少量 PKA 的作用敏感，因为这会延长由 PKA 本身产生的血管扩张剂缓激肽的血浆半衰期。另一方面也有证据表明，即使 PKA 含量低也可能引起不良反应，其机制尚不清楚。因此尽管现行生产工艺生产的白蛋白 PKA 含量低，但是从临床用药安全考虑仍需严格控制白蛋白制品 PKA 残留量。

PKA 测定采用显色底物法。取适量用国际标准品标定的 PKA 国家标准品，制成系列 PKA 标准溶液，取供试品适量，制成供试品溶液，分别向 PKA 系列标准品溶液和供试品溶液中加入前激肽释放酶（PK），在 PKA 的作用下生成激肽释放酶，使特异性显色基质显色，在特定波长下测定吸光度，以 PKA 标准品溶液的 PKA 活性的对数对其相应的吸光度对数作直线回归，求得直线回归方程，计算出供试品 PKA 含量。

2 材料和设备

- 2.1 0.05mol/L 三羟甲基氨基甲烷-盐酸（Tris-HCl）缓冲液（含 0.15mol/L NaCl 溶液，简称 TNB）：称取 6.06g 三羟甲基氨基甲烷（Tris 分子量 121.14）及 8.77g 氯化钠溶于适量蒸馏水中，用 1mol/L HCl 调节 pH 至 8.0，补加蒸馏水至 1000ml。
- 2.2 前激肽释放酶（PK）：采用适宜方法提纯 PK，小体积分装，-30℃以下保存备用。
- 2.3 2mol/L 激肽释放酶显色底物（S-2302）：称取 12.5mg S-2302，加 10ml 蒸馏水溶解。
- 2.4 50%冰醋酸：50ml 冰醋酸加蒸馏水使成 100ml。
- 2.5 PKA 国家标准品。
- 2.6 全自动酶标仪。
- 2.7 96 孔微量滴定板。

3 操作方法

用 TNB 将 PKA 国家标准品分别稀释成 1.0IU、2.0IU、3.0IU、4.0IU、5.0IU 的标准溶液。取供试品适量，用 TNB 稀释 10 倍（如 20μl 待检品加 180μl TNB）。于 96 孔微量滴定板反应孔内分别加入 20μl 标准溶液或供试品稀释液，向每孔加 20~50μl PK 同时开动秒表计时，向每孔

加 PK 的时间间隔应相同,然后将板放于微量振荡器上振荡 1 分钟,加盖于室温下(25~30℃)准确放置 30 分钟后,按加 PK 的同样顺序和时间间隔向各反应孔加 20μl 的 2mol/L S-2302,于微量振荡器上振荡 1 分钟,加盖于室温下准确培育 15 分钟后,然后再以同样的顺序和时间间隔加 20μl 50%冰醋酸,振荡 1 分钟后,于 405nm 波长下测定各反应孔的 A 值。同时以 TNB 20~50μl 代替 PK 20~50μl,同法操作,作为空白对照。以 PKA 标准品溶液的 PKA 活性的对数对其相应的吸光度对数作直线回归,求得直线回归方程,计算出供试品 PKA 活性。每个标准和供试品做 3 孔,其中 2 个测定孔,1 个对照孔。

4 计算

4.1 计算每个标准品和供试品的 A 值,即:

$$A = (A_{\text{测定1}} + A_{\text{测定2}}) / 2 - A_{\text{对照}}$$

4.2 以 PKA 标准品溶液的 PKA 活性的对数对其相应的 A 值的对数作直线回归,求出直线回归方程。将待检样品的 A 值的对数值代入方程,计算出相应值的反对数,即得供试品的 PKA 活性。

5 结果与判定

除另有规定外,PKA 含量应不高于 35IU/ml。

6 注意事项

- 6.1 两个测定孔的 A 值相差小于 0.020。
- 6.2 线性回归的相关系数应不低于 0.99。
- 6.3 加 PK、S-2302 及 50%冰醋酸溶液时,各孔的间隔时间应相同,加液的顺序要一致,尽可能使各孔处于同一反应条件下。
- 6.4 加 PK 和加 S-2302 溶液后的放置时间系从第一孔加液时算起。
- 6.5 如果环境温度低于 25℃,应分别在两次反应过程的限定时间内于 37℃放置 10 分钟。

起草人:赵卉 王威

复核人:侯继锋 王箫舟

人血白蛋白醋酸纤维素薄膜电泳纯度测定法

1 原理

人血白蛋白是由多份健康人血浆合并,经低温乙醇沉淀等蛋白分离法纯化提制出来的,其纯度越高质量越好,也更安全有效。

《中国药典》2015 年版三部采用醋酸纤维素薄膜电泳法测定人血白蛋白纯度,要求人血白蛋白纯度不低于蛋白质总量的 96.0%。

电泳法是指利用溶液中带有不同量电荷的阳离子或阴离子,在外加电场中使供试品组分以不同的迁移速度向对应的电极移动,实现分离并通过适宜的检测方法记录或计算,达到测定目的的分析方法。醋酸纤维素薄膜电泳法是以醋酸纤维素薄膜为支持介质,蛋白质等大分子在电场的作用下,按各自的速度向极性相反的电极方向泳动,使蛋白组分分离成狭窄的区带,经氨

基黑或丽春红染色后,在色谱扫描仪上记录各组分的区带图谱,按峰面积计算目的蛋白质占蛋白质总量的百分比。

醋酸纤维素薄膜介质孔径大,没有分子筛效应,主要凭借被分离物中各组分所带电荷量的差异进行分离,适用于血清蛋白、免疫球蛋白、脂蛋白、糖蛋白、类固醇激素及同工酶等的检测。

2 材料和设备

2.1 材料和试剂 醋酸纤维薄膜、巴比妥缓冲液、丽春红染色液、冰醋酸洗脱液及透明液等可按药典方法自行配制,也可由仪器厂家配套提供。

2.2 巴比妥缓冲液(pH8.6) 取巴比妥 2.76g、巴比妥钠 15.45g,加水溶解使成 1000ml。

2.3 染色液常用的有以下几种,可根据需要,按各品种项下要求使用。

2.3.1 氨基黑染色液:取 0.5g 的氨基黑 10B,溶于甲醇 50ml、冰醋酸 10ml 及水 40ml 的混合液中。

2.3.2 丽春红染色液:取丽春红 9.04g、三氯醋酸 6g,用水溶解并稀释至 100ml。

2.3.3 含有醋酸的丽春红染色液:取丽春红 0.1g,醋酸 5ml,用水制成 100ml 的溶液。4℃ 保存。

2.3.4 含有三氯醋酸和 5-磺基水杨酸的丽春红染色液:取丽春红 2g,三氯醋酸 30g,5-磺基水杨酸 30g,用水溶解并稀释至 100ml。

2.4 脱色液 取乙醇 45ml、冰醋酸 5ml 及水 50ml,混匀。

2.5 透明液 取冰醋酸 25ml,加无水乙醇 75ml,混匀。

2.6 设备 电泳室及直流电源或全自动电泳分析系统。

3 自动化电泳分析操作方法

3.1 醋酸纤维素薄膜浸润 醋酸纤维素薄膜片浸入巴比妥缓冲液中,完全浸透后取出,室温干燥片刻以除去多余缓冲液。

3.2 点样与电泳 于膜条上距负极端约 2cm 处,点样滴加蛋白质含量约 5%的供试品溶液 2~3 μ l,然后按照仪器要求,在稳流条件下电泳至区带距离 4~5cm 为宜,电泳时间以白蛋白与免疫球蛋白之间的电泳展开距离约 2cm 为宜。

3.3 染色和脱色 电泳完毕后膜条浸于氨基黑或丽春红溶液中染色,2~3 分钟后,用多份脱色液浸洗数次,直至脱去底色为止。

3.4 透明和烘干 脱色后的膜条浸于透明液中进行透明处理,一般浸泡 10~15 分钟,待全部浸透后,取出进行烘干处理。

4 图谱扫描和含量计算

干燥后的醋酸纤维素薄膜用薄层色谱扫描仪采用透射方式在记录器上自动绘出各蛋白质组分曲线图,横坐标为膜条的长度,纵坐标为吸光度,计算各蛋白质组分的含量(%).亦可用微机处理积分计算。

人血白蛋白按峰面积计算各蛋白质组分的含量(%).

5 结果与判定

实验成立条件：以人血清或机器自带质控作为对照，其中白蛋白峰面积应在相应范围之内（如 50.6%~63.4%）。

判定标准：人血白蛋白的峰面积要不小于 96.0%。

6 注意事项

6.1 不同规格人血白蛋白应稀释到蛋白含量为 5%左右再进行电泳分析。

6.2 用微机处理积分计算人血白蛋白含量时，应同时观察染色干燥后的醋酸纤维素薄膜片，是否有相应的显色区带，防止醋酸纤维素薄膜片上的杂质污染造成机器识别错误，计入信号积分。

起草人：管利东 王敏力

复核人：侯继锋 王菁舟

乙型肝炎病毒表面抗原检查法

1 原理

利用酶联免疫吸附原理测定人血液制品中乙型肝炎病毒表面抗原。基本原理是酶分子与抗体或抗体分子共价结合，此种结合不会改变抗体的免疫学特性，也不影响酶的生物学活性。此种酶标记抗体可与吸附在固相载体上的抗原或抗体发生特异性结合。滴加底物溶液后，底物可在酶作用下使其所含的供氢体由无色的还原型变成有色的氧化型，出现颜色反应。因此，可通过底物的颜色反应来判定有无相应的免疫反应，颜色反应的深浅与标本中相应抗体或抗原的量呈正比。此种显色反应可通过 ELISA 检测仪进行定量测定，这样就将酶化学反应的敏感性和抗原抗体反应的特异性结合起来。一般乙型肝炎病毒表面抗原诊断试剂盒采用双抗体夹心法酶联免疫吸附原理，用于人血清或血浆产品中乙型肝炎病毒表面抗原的检测。

2 材料和设备

使用经国家批批检定合格的试剂盒、水浴箱、洗板机、酶标仪。

3 操作方法

3.1 按试剂盒说明书进行。

3.2 检测。

4 计算

4.1 按试剂盒说明书计算临界值。

4.2 供试品 A 值小于临界值为阴性，大于临界值为阳性。

5 结果与判定

阳性供试品需重新取样加倍量复试，复试半数以上阳性视为阳性，阳性者用中和试验进行

确认试验，确认试验阳性的判定为阳性。

6 注意事项

操作前须仔细阅读试剂盒说明书，并按其注意事项进行。

起草人：郝杰 王敏力

复核人：侯继锋 王菁舟

静注人免疫球蛋白及特异性人免疫球蛋白

简 述

人免疫球蛋白分为静注人免疫球蛋白及肌注人免疫球蛋白，原料来自于人血浆。采用目前最常用的低温乙醇蛋白分离法（也可使用盐析法、色谱法等），分离出人血浆中的组分Ⅱ，再经过层析、超滤、过滤等纯化步骤，并经病毒去除和灭活处理，添加适宜稳定剂后经除菌过滤后分装制成。由于每批静注人免疫球蛋白产品的原料都是经由 1000 名以上供浆者的血浆混合而成，因此其产品中的抗体种类丰富，可提高人体免疫力，用于多种与免疫相关的疾病的预防和治疗。静注人免疫球蛋白主要用于原发性或继发性免疫球蛋白缺乏症、重症感染的治疗，也可以用于治疗一些自身免疫性疾病（如原发性血小板减少性紫癜、川崎病等）。

检验项目及标准规定应依据现行版《中国药典》或其他国家药品标准进行。检验方法应按照《中国药典》通则的方法进行。

主要项目有：不溶性微粒检查、渗透压摩尔浓度、激肽释放酶原激活剂、抗补体活性、抗 A、抗 B 血凝素、纯度、分子大小分布、特异性抗体效价、异常毒性检查等。

鉴别试验（免疫电泳法）

1 原理

采用琼脂糖电泳和双扩散相结合的方法对样品进行分析。由于不同蛋白质的分子量及其所带电荷的性质、数量不同，在琼脂糖介质中，在电场的作用下，不同蛋白质的泳动速度不同，从而达到分离不同蛋白质的作用；之后再在琼脂糖板上挖槽，加入抗人血浆抗体，经过免疫双扩散，不同的蛋白质会在其相应的位置与抗体反应而出现沉淀弧，通过与用作对照品的正常人血清与抗体反应所产生沉淀弧位置的对比，就可以确定待检样品的蛋白质属性。

2 材料和设备

2.1 电泳仪和电泳槽。

2.2 1.5%琼脂糖：称取 1.5g 琼脂糖加蒸馏水和缓冲液各 50ml，加热融化。

2.3 巴比妥缓冲液（pH8.6）称取巴比妥 4.14g，巴比妥钠 23.18g，叠氮钠 0.15g，加蒸馏水 1500ml。

2.4 0.5%氨基黑染液 称取氨基黑 10B 0.5g 溶于 50ml 甲醇，10ml 冰醋酸及 40ml 蒸馏水的混合液中。

2.5 0.05%溴酚兰 称取 50mg 溴酚兰，用 100ml 蒸馏水溶解。

2.6 脱色液 取 45ml 乙醇，5ml 冰醋酸，50ml 蒸馏水混合。

2.7 混合人血清。

2.8 兔（羊）抗人血清（血浆）：双扩散效价应不低于 1:16。

2.9 不同规格的移液器、玻璃板，打孔器、湿盒、刀片等。

3 操作方法

3.1 制板 用微波炉或热水浴将 1.5%的琼脂糖溶化后，倒在玻璃板上制成厚 3mm 的琼脂糖凝胶板。

3.2 打孔 在琼脂糖降温凝固后，于琼脂板的 1/4 处用直径 3mm 的打孔器打样品孔，孔距 10~15mm。

3.3 加样 对样品进行适当稀释（至蛋白浓度约为 0.5%~1%），每孔加样 10 μ l，人血清（血浆）对照孔加 1 滴溴酚兰作指示剂。

3.4 电泳 用滤纸搭桥和缓冲液接触，100~150V 恒压电泳约 1~2 小时（指示剂迁移到前沿）。

3.5 扩散 电泳结束后，在两孔之间离两端约 3~5mm 处用刀片挖宽约 2~3mm 槽。向槽中加入抗血清（血浆）约 150 μ l。放湿盒中 37 $^{\circ}$ C 扩散 24 小时。

3.6 浸泡 用 0.9%氯化钠溶液或蒸馏水浸泡去除未结合蛋白，期间注意换水。

3.7 干燥 琼脂板置室温自然干燥。

3.8 染色及脱色 将干燥的琼脂薄膜用 0.5%氨基黑染液溶液染色 10~20 秒；用脱色液脱色至本底基本无色。

3.9 琼脂干胶制备和保存 按鉴别试验（免疫双扩散法）方法进行。也可以用影像分析系统进行扫描并打印图谱。

4 结果判定

待测蛋白质的沉淀线应和血清（血浆）对照孔中相应蛋白所处的位置相一致，主要沉淀线应为待测蛋白质。

5 注意事项

5.1 制备琼脂板时，玻璃板应放置在水平面上，防止琼脂板厚度不均。

5.2 打孔和挖槽时不要将琼脂糖剥离玻璃板以免待检样品或抗人血浆漏到琼脂糖下面，影响实验结果。

5.3 电泳时应有冷却系统，否则琼脂糖凝胶会出现干裂。

5.4 琼脂糖浸泡去除未结合蛋白后,也可以先染色再干燥琼脂糖以制备干胶。

起草人:王威 管利东

复核人:侯继锋 王菁舟

乙型肝炎表面抗体检查法(抗 HBs)

1 原理

采用放射免疫学方法测定人免疫球蛋白类产品的抗 HBs 效价。将不同稀释度的标准品和供试品与包被有 HBs 抗原的珠子放在一起孵育后,抗体会与抗原结合,洗去未结合的蛋白;加入 ^{125}I 标记的 HBs 抗原,形成双抗原夹心;孵育、洗涤后,用 γ 计数器测定每个样品的 CPM 值。由于 CPM 值与供试品中的 HBs 抗体含量成正比,通过代入标准品的回归曲线,就可以测出不同稀释度样品的抗 HBs 抗体含量。

2 材料

- 2.1 抗 HBs 试剂盒(RIA 法)。
- 2.2 抗 HBs 国家标准品。
- 2.3 稀释液:0.9%氯化钠溶液。
- 2.4 γ 计数器。
- 2.5 洗珠器。
- 2.6 水浴箱。
- 2.7 不同规格的移液器、试管等。

3 操作方法

- 3.1 用稀释液将国家标准品和供试品进行适宜倍数的稀释。
- 3.2 试验按试剂盒说明书进行。
- 3.3 打开 γ 计数器,待仪器进行自检后,打开相应操作界面,选择读取原始数值并减空白。

4 计算

- 4.1 先计算标准品和供试品的 CPM 值均值。
- 4.2 求出标准品的双对数回归方程。
- 4.3 将供试品的 CPM 值代入回归方程,求出样品抗 HBs 含量 A 值(mIU/ml)。
- 4.4 供试品抗 HBs 含量按下式计算:

$$\text{供试品抗 HBs 含量 (IU/ml)} = A \times \text{稀释倍数} \div 1000$$

- 4.5 将不同稀释度供试品的抗 HBs 含量求均值,即为供试品的抗 HBs 含量。

5 结果与判定

- 5.1 标准曲线回归方程的相关系数 r 值应大于 0.95,否则试验不成立。
- 5.2 应做阴阳性对照并计算临界值,以确定标准品和供试品是否可进行计算。

6 注意事项

- 6.1 供试品稀释一般按人免疫球蛋白类（人免疫球蛋白、静注人免疫球蛋白、破伤风人免疫球蛋白、狂犬病人免疫球蛋白等）进行 10、20、40、80、160 倍稀释；乙型肝炎人免疫球蛋白可进行 1000、1500、2000 倍稀释。
- 6.2 抗 HBs 试剂盒使用前应平衡至室温。
- 6.3 抗 HBs 标准品计算时不得少于四点。
- 6.4 所有测定操作应按同位素实验室安全防护制度执行。

起草人：王威 郝杰

复核人：侯继锋 王芳舟

白喉抗体检查法

1 原理

本法系依据绵羊红细胞经醛化和鞣酸化处理后，具有较强的吸附蛋白质的能力，能将白喉类毒素吸附于红细胞表面上，若遇到供试品中相应抗体，会发生抗原抗体结合，产生特异性凝集，通过比较凝集反应终点测定供试品中白喉抗体效价。

2 材料和设备

- 2.1 微量 VU 型血凝板。
- 2.2 37℃ 培养箱。
- 2.3 人免疫球蛋白白喉抗体国家标准品。
- 2.4 白喉抗体诊断红细胞。
- 2.5 兔血清须经 56℃ 30 分钟灭活。
- 2.6 含 1%兔血清氯化钠溶液（简称 R.S.N.S）：0.5ml 兔血清+49.5ml 0.9%氯化钠溶液。

3 操作方法

- 3.1 冻干白喉抗体诊断红细胞 1 支加 4.5ml 1%兔血清氯化钠溶液，使红细胞膨胀复原。
- 3.2 人免疫球蛋白白喉抗体国家标准品稀释：取白喉抗体国家标准品 1 支，加 1ml 蒸馏水溶解复溶。取标准品 0.2ml+0.2ml 1%兔血清 0.9%氯化钠溶液稀释成含 0.2HAU/ml 白喉抗体溶液，以此为起始标准液。
- 3.3 供试品稀释：一般 1:4 稀释，取供试品 0.1ml+0.3ml R.S.N.S
- 3.4 取洗净的 VU 型血凝板，用移液器每孔加 0.025ml R.S.N.S。
- 3.5 取含 0.2HAU/ml 的白喉抗体国家标准品 0.025ml，加入血凝板第一排第 1 孔中。
- 3.6 取 1:4 稀释的样品 0.025ml，加入第二排第 1 孔，若同时做几个样品，可依次加入第三排第 1 孔，第四排第 1 孔，依次类推。
- 3.7 用 0.025ml 移液器从第 1 孔倍比稀释标准品及待检品至第 11 孔，最后第 11 孔吸弃去 0.025ml，第 12 孔为血细胞对照孔。
- 3.8 每孔加 0.025ml 白喉抗体诊断血细胞，振荡混匀 30 秒，放温盒内 37℃ 结合 1 小时。

4 结果观察及判定

从孵箱取出血凝板后,观察每孔中血凝情况并记录之。

血细胞对照孔呈典型的“-”图,该试验成立。

+++红细胞凝集呈均匀分布。

++大部分红细胞凝集呈均匀分布,孔底中央有很弱的小红圈。

++红细胞部分凝集,孔底中央有一疏松的小红圈。

+大部分红细胞沉于孔底中央,周围有少量凝集的红细胞。

-红细胞集中在孔底中央,呈一边缘光滑致密的小红点。

白喉抗体国家标准品及待检样品均以“++”为凝集试验终点,以出现“++”的最高稀释倍数为该供试品含白喉抗体最高滴定。

5 计算

供试品中白喉抗体含量计算: $\text{HAU/ml} = \text{血凝单位/ml}$

供试品中白喉抗体含量计算 = 白喉抗体国家标准品终点稀释倍数所含白喉抗体数 (HAU/ml) × 待检品最高滴度 = HAU/ml 白喉抗体。

(注:根据文献介绍,用家兔皮内法测得的白喉抗体国际单位,与用血凝试验法测得的白喉抗体含量不一致,为与国际单位区别开,用血凝试验测得的白喉抗体叫做血凝单位,即 HAU)。

6 注意事项

血凝板孔要保持清洁干净,避免表面磨损,否则红细胞不易下沉,易出现假阳性。

起草人:周倩 赵卉

复核人:侯继锋 王菁舟

激肽释放酶原激活剂含量测定法

1 原理

血浆激肽释放酶原也称前激肽释放酶(PK),它可以被激肽释放酶原激活剂(PKA)激活成具有蛋白水解活性的激肽,参与炎症反应、超敏反应、免疫复合反应、器官移植的排斥反应等一系列的生理病理过程,能激发激肽系统的激活剂以及其中间产物均有降压作用。PKA会引起血管舒张,血压下降。接受血管紧张素转化酶抑制剂治疗患者对少量PKA的作用敏感,因为这会延长由PKA本身产生的血管扩张剂缓激肽的血浆半衰期。另一方面也有证据表明,即使PKA含量低也可能引起不良反应,其机制尚不清楚。因此尽管现行生产工艺生产的制品中PKA含量低,但是从临床用药安全考虑仍需严格控制PKA残留量。PKA测定采用显色底物法。取适量用国际标准品标定的PKA国家标准品,制成系列PKA标准溶液,取供试品适量,制成供试品溶液,分别向PKA系列标准品溶液和供试品溶液中加入前激肽释放酶,在PKA的作用下生成激肽释放酶,使特异性显色基质显色,在特定波长下测定吸光度,以PKA标准品溶液的PKA活性的对数对其相应的吸光度对数作直线回归,求得直线回归方程,计算出供试品PKA含量。

2 材料和设备

2.1 0.05mol/L 三羟甲基氨基甲烷-盐酸 (Tris-HCl) 缓冲液 (含 0.15mol/L NaCl 溶液, 简称 TNB): 称取 6.06g 三羟甲基氨基甲烷 (Tris 分子量 121.14) 及 8.77g 氯化钠溶于适量蒸馏水中, 用 1mol/L HCl 调节 pH 至 8.0, 补加蒸馏水至 1000ml。

2.2 前激肽释放酶 (PK) 采用适宜方法提纯 PK, 小体积分装, -30°C 以下保存备用。

2.3 2mol/L 激肽释放酶显色底物 (S-2302) 称取 12.5mg S-2302, 加 10ml 蒸馏水溶解。

2.4 50%冰醋酸 50ml 冰醋酸加蒸馏水使成 100ml。

2.5 PKA 国家标准品。

2.6 全自动酶标仪。

2.7 96 孔微量滴定板。

3 操作方法

用 TNB 将 PKA 国家标准品分别稀释成 1.0IU、2.0IU、3.0IU、4.0IU、5.0IU 的标准溶液。取供试品适量, 用 TNB 稀释 10 倍 (如 20 μl 待检品加 180 μl TNB)。于 96 孔微量滴定板反应孔内分别加入 20 μl 标准溶液或供试品稀释液, 向每孔加 20~50 μl PK 同时开动秒表计时, 向每孔加 PK 的时间间隔应相同, 然后将板放于微量振荡器上振荡 1 分钟, 加盖于室温下 ($25\sim 30^{\circ}\text{C}$) 准确放置 30 分钟后, 按加 PK 的同样顺序和时间间隔向各反应孔加 20 μl 的 2mol/L S-2302, 于微量振荡器上振荡 1 分钟, 加盖于室温下准确培育 15 分钟后, 然后再以同样的顺序和时间间隔加 20 μl 50%冰醋酸, 振荡 1 分钟后, 于 405nm 波长下测定各反应孔的 A 值。同时以 TNB 20~50 μl 代替 PK 20~50 μl , 同法操作, 作为空白对照。以 PKA 标准品溶液的 PKA 活性的对数对其相应的吸光度对数作直线回归, 求得直线回归方程, 计算出供试品 PKA 活性。每个标准和供试品做 3 孔, 其中 2 个测定孔, 1 个对照孔。

4 计算

4.1 计算每个标准和供试品的 A 值, 即:

$$A = (A_{\text{测定1}} + A_{\text{测定2}}) / 2 - A_{\text{对照}}$$

4.2 以 PKA 各稀释度标准活性的对数对相应的各标准的 A 值的对数作直线回归处理, 求出直线回归方程。将待检样品的 A 值的对数值代入方程, 计算出相应值的反对数, 即得待检样品的 PKA 活性。

5 结果与判定

除另有规定外, PKA 含量应不高于 35IU/ml。

6 注意事项

6.1 两个测定孔的 A 值相差小于 0.020。

6.2 线性回归的相关系数应不低于 0.99。

6.3 加 PK、S-2302 及 50%冰醋酸溶液时, 各孔的间隔时间应相同, 加液的顺序要一致, 尽可能使各孔处于同一反应条件下。

6.4 加 PK 和加 S-2302 溶液后的放置时间系从第一孔加液时算起。

6.5 如果环境温度低于 25℃，应分别在两次反应过程的限定时间内于 37℃ 放置 10 分钟。

起草人：赵卉 王威

复核人：侯继锋 王菁舟

抗补体活性测定法 (ACA)

1 原理

静脉注射用人免疫球蛋白制品需进行 ACA 测定。IgG 聚合体会通过补体经典途径激活补体，从而消耗补体，此活性通常称为 ACA。应该指出的是 IgG 聚合体可能造成补体消耗，但是像已证明的那样，无聚合体的静脉注射用人免疫球蛋白不等于无 ACA，反之含聚合体的也不一定有 ACA。原因是经过化学或酶修饰过的 IgG 也可能对其聚合体进行能降低激活补体活性的修饰。另一方面，不是每一个物理化学诱导的聚合，必定会导致能激活补体的聚合体合成。本实验采用免疫溶血反应作指示系统，根据供试品消耗补体所反映出的溶血率变化，测定供试品的抗补体活性。

2 材料和设备

2.1 镁-钙储备液：称取氯化钙 1.103g，氯化镁 5.083g，加蒸馏水溶解至 25ml。

2.2 巴比妥缓冲液贮备液：称取氯化钠 41.5g，巴比妥钠 5.1g，加蒸馏水 800ml 溶解。用 1mol/L 盐酸调 pH 至 7.3，加镁-钙储备液 2.5ml，再用蒸馏水稀释至 1000ml，4℃ 保存备用。

2.3 明胶巴比妥缓冲液：称取明胶 0.625g，加 30ml 少量蒸馏水煮沸溶解，加巴比妥缓冲液 100ml，加蒸馏水稀释至 500ml，当天配置。

2.4 绵羊红细胞：采集后 4℃ 保存 1 周后方可使用。

2.5 溶血素：兔抗羊红细胞血清。

2.6 豚鼠血清（补体）：取 10 只以上的豚鼠血清，混合，4℃ 离心除去红细胞分装，豚鼠血清的补体总活性应不低于 100CH₅₀/ml。

2.7 仪器：紫外可见分光光度计。

3 操作方法

3.1 制备 5% 羊红细胞悬液 取 2.4 项的绵羊红细胞 10ml (约 1ml 绵羊红细胞)，用明胶巴比妥缓冲液洗涤，2000 转/分钟离心 5 分钟，弃去上清，至少三次。最后吸取 1ml 绵羊红细胞于 20ml 明胶巴比妥缓冲液中。取 0.2ml 绵羊红细胞悬液，加入 2.8ml 蒸馏水中，混匀使绵羊红细胞溶解，于 541nm 波长测定吸光度。根据下述公式计算需要/取出的明胶巴比妥缓冲液的体积，使得该溶液吸光度调节至 0.62±0.01。此时该绵羊红细胞浓度为 1×10⁹/ml。

$$V_f = V_i \times A / 0.62 \quad (\Delta V = V_i \times A / 0.62 - V_f)$$

式中，V_i 为稀释前绵羊红细胞悬液体积；A 为稀释前绵羊红细胞悬液吸光度；V_f 为稀释后绵羊红细胞悬液体积。

3.2 溶血素滴定 稀释溶血素：取 0.1ml 溶血素加 9.9ml 明胶巴比妥缓冲液，1:100 稀释。

取试管 8 支分别加入明胶巴比妥缓冲液 1ml，0 管、1 管各加 1ml 1:100 倍稀释的溶血素，然后从第 1 管开始倍倍稀释到第 8 管，稀释倍数分别为 100、200、400、800、1600、3200、6400。

37℃培育 60 分钟，冰浴 3~5 分钟，2000l 转/分钟离心 5 分钟，取上清 541nm 波长测 OD。计算：

$$y \text{ 值} = \text{每管 OD 值} \div \text{全溶血 OD 值}$$

以稀释后的补体用量 (y) 对 $y/(1-y)$ 值 (x) 做双对数直线回归，从而求直线回归的截距 (A)、斜率 (B)、回归系数 (R)

$$\text{双对数回归: } A = \quad B = \quad R =$$

补体活性按下式计算：

$$\text{补体活性 (CH}_{50}/\text{ml)} = 1/x \times \text{补体稀释倍数} \div 5$$

式中，1/x 为 A 值反对数的倒数。

本试验直线回归斜率 (B) 在 0.15~0.40，最好在 0.18~0.30 试验成立。

3.5 抗补体活性测定 根据 3.3.4 项测得豚鼠血清补体活性，用明胶巴比妥缓冲液稀释至 100CH₅₀/ml，按下表制备培育混合物。

	供试品	补体对照
明胶巴比妥缓冲液 (ml)	0.6	0.8
供试品 (50mg/ml) (ml)	0.2	/
补体 (100CH ₅₀ /ml) (ml)	0.2	0.2

静脉注射用免疫球蛋白 (IVIG) 是按 50mg/ml 浓度计算的。如果 IVIG 的浓度不是 50mg/ml 时，则按下列公式计算 IVIG (V)

$$V (\text{ml}) = 10\text{mg}/\text{供试品蛋白质含量} (\text{mg/ml})$$

然后再根据 IVIG 的实际取量计算明胶巴比妥缓冲液的加量，使供试品加缓冲液的总量为 0.8ml。将此混合物在 37℃ 水浴保温 60 分钟，取出 0.2ml 加 9.8ml 明胶巴比妥缓冲液 (50 倍稀释)，按滴定补体活性方法测定剩余补体活性。

4 计算

$$\text{供试品抗补体活性} (\%) = (D-G) / D \times 100$$

式中，D 表示补体对照剩余补体活性；G 表示供试品管剩余补体活性。

本试验补体对照管剩余补体活性在 80~120CH₅₀/ml 试验成立。

5 结果与判定

除另有规定外，供试品 ACA 活性应不高于 50%。

6 注意事项

- 6.1 洗红细胞时，务必将白细胞弃掉。
- 6.2 敏化红细胞时一定要慢慢轻摇。
- 6.3 仅允许使用澄清明胶溶液。

起草人：赵卉 王威

复核人：侯继锋 王菁舟

抗 A、抗 B 血凝素测定法

1 原理

静注人免疫球蛋白系从人血浆中分离提取，其中含有一定量的 IgG 型抗 A、抗 B 抗体，即抗 A、抗 B 血凝素。在临床上用于非 O 型血患者时，其中含有的抗 A (B) 抗体可与患者红细胞表面的 A (B) 抗原结合，有诱导产生溶血反应的风险。试管抗人球蛋白法是血清学中检测 IgG 抗体的经典方法。其原理为 37℃ 环境下孵育红细胞和 IgG 型抗体，使红细胞与抗体结合，再加入抗人球蛋白试剂作为桥联，形成肉眼可见的凝集反应。《中国药典》2015 年版对静注人免疫球蛋白中抗 A、抗 B 血凝素滴度的要求为 $\leq 1:64$ ，认为抗体滴度高于 1:64 的产品具有较高的诱导溶血反应的风险，准确测定静注人免疫球蛋白中抗 A、抗 B 血凝素滴度对于用药安全是十分必要的。

2 材料和设备

2.1 A1、B 型红细胞 各 3 例，分别混合，用适量生理氯化钠溶液洗 3 次，最后一次 2000r/min 离心 5 分钟，分别用 0.9% 氯化钠溶液配成 5% 红细胞悬液，红细胞采血一周内使用。也可购买商品化试剂红细胞，效期内使用。

2.2 抗人球蛋白试剂 用前须标定，选择适宜稀释度用于试验。

2.3 AB 血清 分离 AB 型健康人血清，用于阴性对照。

2.4 抗 D IgG 型，适用于酶法或抗人球蛋白法，用于阳性对照。

2.5 离心机。

3 操作方法

将 75 × 12mm 小试管排成两列，每列 8 支。自第 2 管起每支加 0.2ml 0.9% 氯化钠溶液，将供试品稀释；加入相应 5% (V/V) 红细胞悬液 0.2ml，混匀，置 37℃ 水浴保温 30 分钟。取出用适量 0.9% 氯化钠溶液洗涤 3 次，每次离心 1 分钟（每分钟 2000 转），每管加入抗人球蛋白血清 0.2ml，混匀，每分钟 1000 转离心 1 分钟，肉眼观察结果。与试验同步，分别用 AB 血清、抗 D 血清、生理盐水替代样品做阴性、阳性、血球对照。

4 结果判定

4.1 观察阴性、阳性、红细胞对照结果，均应成立。

4.2 抗 A、抗 B 血凝素滴度以产生“+”凝集的供试品最高稀释度计算，不计红细胞悬液及抗人球蛋白血清体积。

4.3 判定标准执行 2015 年版《中国药典》三部要求，静注人免疫球蛋白中抗 A、抗 B 血凝素 $\leq 1:64$ 。

起草人：马秋平 管利东
复核人：侯继锋 王菁舟

人免疫球蛋白中甘氨酸含量测定法

1 原理

为防止 IgG 聚合,人免疫球蛋白制品添加氨基酸、糖及糖醇作稳定剂,如甘氨酸、葡萄糖、蔗糖等。本法依据过量的 6-氨基喹啉基-N-羧基琥珀酰亚氨基氨基甲酸酯(AQC)在一定条件下和氨基酸形成稳定的衍生产物(柱前衍生),用高效液相色谱法测定衍生产物,根据衍生产物的含量计算人免疫球蛋白中甘氨酸含量。本法采用十八烷基硅烷键合硅胶为基质的 C18 反相色谱柱,检测波长为 248nm,以 α -氨基丁酸为内标物。供试品用磺基水杨酸沉淀除去蛋白质后的上清液和各对照品溶液分别加入内标物,再分别加入衍生剂,形成稳定的衍生产物,精密量取对照品溶液与供试品溶液,分别注入液相色谱仪,记录色谱图,按内标法计算供试品甘氨酸含量。

2 材料和设备

2.1 甘氨酸对照品溶液 精密称取甘氨酸对照品 2.5g,加超纯水定容至 100ml。

2.2 内标(α -氨基丁酸)溶液 精密称取 α -氨基丁酸对照品 0.4g,加超纯水定容至 100ml。

2.3 1.5%磺基水杨酸 称取 1.5g 磺基水杨酸,溶于 100ml 超纯水中,混匀备用。

2.4 洗脱液

A 液: 140mmol/L 醋酸钠、17mmol/L 三乙胺、1 μ g/ml 乙二胺四乙酸二钠混合液,用氢氧化钠调 pH 至 5.65 混匀。

B 液: 100%乙腈(色谱醇)。

C 液: 超纯水。

2.5 衍生剂

2.6 高压液相色谱柱 C18 反向色谱柱,3.9mm \times 150mm,4 μ m。

2.7 HPLC 系统: 高效液相色谱系统,紫外检测器。

3 操作方法

3.1 甘氨酸对照品溶液制备 精密量取甘氨酸对照品溶液 1.0ml,加 9.0ml 磺基水杨酸,混匀静置 2 小时以上 3000 转/分钟离心 10 分钟,留取上清备用。①分别精密量取上清液 0.4ml、0.8ml、1.0ml、1.2ml、1.6ml,置 10ml 量瓶中,用超纯水定容,得到甘氨酸浓度分别为 0.10g/L、0.20g/L、0.25g/L、0.30g/L、0.40g/L。②分别精密量取①项中各甘氨酸标准溶液 0.1ml,加 0.4ml 超纯水,加内标 0.02ml 混匀备用。

3.2 供试品溶液的制备 精密量取供试品溶液 1.0ml,加 9.0ml 磺基水杨酸,混匀静置 2 小时以上 3000 转/分钟离心 10 分钟,留取上清备用。①精密量取离心上清液 1.0ml,置 10ml 量瓶中,用超纯水定容。②精密量取①项中供试品溶液 0.1ml,加 0.4ml 超纯水,加内标 0.02ml 混匀备用。

3.3 对照品溶液及供试品溶液衍生步骤 精密量取 3.1 项甘氨酸标准溶液或 3.2 项供试品溶液 10 μ l 放入衍生管中,加 70 μ l 缓冲液,涡旋混合并加入 20 μ l 衍生剂,涡旋混合 15 秒,备用。

3.4 空白对照品制备 80 μ l 缓冲液,涡旋混合并加入 20 μ l 衍生剂,涡旋混合 15 秒,备用。

3.5 色谱条件 流速: 1.0ml/min。柱温: 37℃±1℃。

紫外检测器检测波长: 248nm。梯度洗脱: 运行时间为 32 分钟。

上样量: 对照品溶液和供试品溶液均上样 10 μ l。

按下表梯度洗脱:

时间/分钟	流速/ml·min ⁻¹	A液/%	B液/%	C液/%	曲线
起始	1.0	100	0	0	*
0.5	1.0	99.0	1.0	0	11
18.00	1.0	95.0	5.0	0	6
19.00	1.0	91.0	9.0	0	6
22.00	1.0	83.0	17.0	0	6
25.00	1.0	0	60.0	40.0	11
28.00	1.0	100	0	0	11
32.00	1.0	100	0	0	6

3.6 系统适应性测试

样品 (0.05%二氢苊): 50mg 二氢苊溶于 100ml 乙腈混匀。

流动相: 乙腈-水 (60:40)。

流速: 1.0ml/min。

进样体积: 10 μ l (6 次进样)。

紫外检测器: 254nm。

运行时间: 10 分钟。

4 计算

用甘氨酸峰面积/内标峰面积所得结果和对应的甘氨酸对照品浓度作直线回归, 得到直线回归方程。将供试品的峰面积比值代入方程, 结果乘以供试品稀释倍数求出供试品甘氨酸含量。

5 结果与判定

除另有规定外, 人免疫球蛋白中甘氨酸含量应为 10~30g/L。

6 注意事项

6.1 直线回归相关系数 应不低于 0.999。

6.2 系统适用性 应符合拖尾因子 (T) 为 0.95~1.40 (甘氨酸和 α -氨基丁酸); RSD 应不大于 2.0%。甘氨酸与相邻色谱峰之间分离度应大于 1.5。

6.3 本方法也可适用于血液制品中组氨酸、精氨酸、盐酸精氨酸、赖氨酸、盐酸赖氨酸等多种氨基酸的测定, 仅对照品改为相应的氨基酸对照品即可。

6.4 根据供试品的氨基酸含量,对照品和供试品的取量可以做适当调整。

起草人:赵卉 王威

复核人:侯继锋 王菁舟

人免疫球蛋白甲型肝炎抗体效价测定法

1 原理

人免疫球蛋白是从健康人血浆中提取制备的一种血液制品,可以用于甲型肝炎流行时的被动免疫预防。伴随着社会发展和卫生条件的改善,甲型肝炎的自然感染率会有一定程度的下降,导致用于提取人免疫球蛋白的血浆中甲肝抗体水平降低,从而影响人免疫球蛋白的甲肝抗体效价。为了保证人免疫球蛋白对甲型肝炎的预防效果,需要对甲肝抗体效价进行测定。

本试验中采用的是酶联免疫法中的竞争法。将甲肝抗原包被于酶标板,加入供试品,然后加入过氧化物酶标记的甲肝抗体与供试品中的甲肝抗体竞争结合包被的甲肝抗原,将未结合的过氧化物酶标记的抗体洗去,加入底物检测结合在酶标板上的甲肝抗体响应值,该响应值在一定范围内与供试品中的甲肝抗体含量成反比。

2 材料和仪器

2.1 人免疫球蛋白甲型肝炎抗体国家标准品。

2.2 anti-HAV ELISA 试剂盒。

2.3 酶标仪。

3 操作方法

将国家标准品按标示量复溶后,稀释至 10mIU/ml、20mIU/ml、30mIU/ml、40mIU/ml、50mIU/ml 作为标准。取稀释好的标准和样品 100 μ l 加入已包被甲肝抗原的酶标板孔中(做双孔平行),密封后 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 小时,加入 50 μ l 抗甲肝 IgG 标记的过氧化物酶,密封后 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时,洗板 5 次,加入 100 μ l 底物室温避光反应 30 分钟,加入 100 μ l 终止液终止反应,450nm 测吸光度(具体实验步骤可根据不同试剂盒说明书适当调整)。

4 计算

以标准浓度对数值为 X 值,以吸光度对数值为 Y 值作双对数直线回归,求得回归方程后,将供试品吸光度代入方程中求加样浓度,根据稀释倍数算出供试品浓度。

5 结果与判定

判定标准执行 2015 年版《中国药典》三部要求,人免疫球蛋白中的甲型肝炎抗体效价 \geq 100IU/ml。

起草人:马秋平 王威

复核人:侯继锋 王菁舟

糖及糖醇含量测定法

1 原理

血液制品特别是免疫球蛋白类制品，在生产工艺过程中通常会添加麦芽糖、葡萄糖、山梨醇、甘露醇等辅料，作为稳定剂和保护剂。为防止高浓度糖醇类物质对机体造成不利，应对其进行检测和控制。糖及糖醇含量采用高效液相色谱法进行测定，连接示差检测器并以苯乙烯-二乙烯基苯共聚物为填料的阳离子交换色谱柱进行定量测定。

2 材料和设备

2.1 高效液相系统

2.1.1 高效液相。

2.1.2 高效液相色谱柱：离子交换色谱柱（ H^+ ），粒度 $9\mu m$ ，内径 $7.8mm$ ，柱长 $300mm$ 。

2.1.3 示差检测器。

2.1.4 色谱软件管理系统。

2.2 样品过滤器（ $13mmID$ ， $0.45\mu m$ ）。

2.3 试剂

2.3.1 1.5%磺基水杨酸（A.R.）溶液 准确称取 $1.5g$ 磺基水杨酸溶于适量超纯水，定容至 $100ml$ 。

2.3.2 麦芽糖标准品溶液 1.0%、2.0%、3.0% 精密称取经减压干燥至恒重的麦芽糖 $1.0g$ 、 $2.0g$ 、 $3.0g$ ，分别用超纯水溶解并定容至 $100ml$ 。

2.3.3 葡萄糖/山梨醇/甘露醇标准品溶液 配制方法如上，浓度依据供试品进行调整，要求标准品溶液浓度涵盖供试品。

2.3.4 流动相： $0.004mol/L$ 硫酸溶液。准确取 $0.24ml$ 浓硫酸用超纯水稀释至 $1000ml$ ， $0.45\mu m$ 膜过滤后备用。

3 操作方法

3.1 麦芽糖的测定

3.1.1 色谱条件

柱温： $50^{\circ}C$ 环境温度：室温

流动相： $0.004mol/L$ 硫酸 流速： $0.8ml/min$

记录时间： $10min$

流速和柱温可依据色谱柱特性调整。

3.1.2 系统检查 按色谱条件将系统平衡至基线稳定。取 $100\mu l$ 超纯水上柱至洗脱液无吸收峰，基线稳定。

3.1.3 系统适用性检测 准确取 2%麦芽糖标准品溶液 $1.0ml$ ，准确加 1.5%磺基水杨酸溶液 $1.0ml$ 混匀制成 1%麦芽糖混合液，系统平衡基线稳定后进 $20\mu l$ 注入色谱柱记录谱图，麦芽糖与磺基水杨酸两峰之间的分离度 R ，拖尾因子（ T ）按麦芽糖峰计算均应符合现行版药典规定。

3.1.4 标准曲线的绘制 取 3 个浓度的麦芽糖或其他糖醇标准品溶液各 $20\mu l$ 上柱测定，以各标准品的浓度对峰面积做直线回归处理，即可得直线回归方程。

3.1.5 供试品测定 准确量取 1.0ml 供试品, 加 4.0ml 1.5% 磺基水杨酸溶液, 混匀, 室温下放置 2 小时以上, 3000 转/分钟离心 10 分钟。取上清液, 用样品过滤器 (0.45 μ m) 过滤。取 20 μ l 滤液上柱测定。

4 计算

将测得的供试品峰面积代入直线回归方程, 即得供试品的糖醇浓度, 再乘以稀释倍数即得。

5 结果与判定

标准曲线相关系数 R 应不低于 0.999。麦芽糖与磺基水杨酸两峰之间的分离度 R、拖尾因子 T 按麦芽糖峰计算均应符合现行版药典规定。

6 注意事项

标准品溶液浓度、供试品取样量、稀释倍数、流速等可做适当调整, 但应经过充分验证和确认。

起草人: 王敏力 赵卉

复核人: 侯继锋 王菁舟

人凝血因子类产品

简 述

人凝血因子类药物主要分为两大类产品, 一类是人血浆提取的人凝血因子类产品, 另一类是重组人凝血因子产品。目前临床上使用的血浆提取的人凝血因子类产品为我国生产, 主要是人凝血因子 VIII、人凝血酶原复合物、人纤维蛋白原。

人凝血因子 VIII (抗血友病因子), 是一种血浆糖蛋白, 在凝血机制的内部途径的级联反应中起着必不可少的作用。血友病 A (HA), 通称甲型血友病, 是一种非常典型的伴性隐性遗传性疾病, 它是患者因先天性凝血因子 VIII 异常或缺乏所导致的凝血机制障碍。目前临床上治疗这种疾病的办法是蛋白替代疗法, 即给病人输注含凝血因子 VIII 的制剂 (包括血浆来源的 VIII 因子和重组 VIII 因子), 这种替代治疗能有效地控制阵发性出血。在 20 世纪 60 年代以前人们大多给患者输注血浆或全血治疗血友病。

人凝血因子产品检验项目及质量标准主要分为以下几大类。

鉴别试验、化学检验项目 (外观、真空度、复溶时间、枸橼酸离子含量、可见异物、装量差异、水份、pH 值、Na⁺ 含量、PEG 残留量等)、生物学活性检验项目 (人凝血因子 VIII 效价、

人凝血因子Ⅸ效价、人凝血因子Ⅱ效价、人凝血因子Ⅶ效价、人凝血因子Ⅹ效价、凝固活力、凝血酶活性、肝素含量、活化的凝血因子)、病毒学检验项目(HBsAg)、安全性检验项目(无菌检查、异常毒性检查、热原质检查)。

生产过程中采用的病毒灭活剂残留量检验项目:磷酸三丁酯含量、聚山梨醇80含量。

2.2 人凝血因子的鉴别试验、化学检验项目、病毒学检验项目、安全性检验项目同人血白蛋白产品,按照《中国药典》三部各论中检验项目的相应通则进行,人凝血因子制品特异检测项目有人凝血因子Ⅷ效价、人凝血因子Ⅱ效价、人凝血因子Ⅷ效价、人凝血因子Ⅸ效价、人凝血因子Ⅹ效价、肝素含量、凝血酶活性、活化的凝血因子、人纤维蛋白原凝固活力、病毒灭活剂磷酸三丁酯和聚山梨醇80残留量。

人凝血因子Ⅷ效价测定法

1 原理

采用一期法原理,即部分凝血活酶试验原理,用人凝血因子Ⅷ缺乏血浆为基质血浆,通过标准品和供试品纠正Ⅷ因子缺乏血浆所致的凝固时间进行测定。将稀释已知效价的人凝血因子Ⅷ国际标准品或国家标准品与Ⅷ因子缺乏血浆的混合物做部分凝血活酶时间APTT测定,建立标准曲线。采用常用的凝固时间统计学方法,将供试品部分凝血活酶时间APTT与标准曲线进行比对,从而计算出供试品中人凝血因子Ⅷ效价。

2 材料和设备

2.1 标准品 人凝血因子Ⅷ WHO 国际标准品或人凝血因子Ⅷ国家标准品。

2.2 主要耗材 移液管、吸头、离心管、塑料管、反应杯等。

2.3 仪器设备 全自动血凝仪。

2.4 试剂 0.9%氯化钠溶液、3.8%枸橼酸钠溶液、咪唑缓冲液、APPT、氯化钙溶液、乏Ⅷ因子血浆等。

3 操作方法

3.1 标准曲线 取一支人凝血因子Ⅷ WHO 国际标准品或人凝血因子Ⅷ国家标准品,平衡至室温后加1.0ml注射用水溶解,用0.9%氯化钠溶液或乏Ⅷ因子血浆预稀释至1.0IU/ml,置冰浴中备用。按照全自动血凝仪操作说明,制作标准曲线。

3.2 待检样品 待检的人凝血因子Ⅷ冻干品平衡室温后,按标示量加注射用水溶解,用0.9%氯化钠溶液或乏因子血浆预稀释至1.0IU/ml,用供试品稀释液稀释至相应的浓度(例如0.5IU/ml、0.25IU/ml)置冰浴中备用。

3.3 仪器操作 按全自动血凝仪设定的程序进行。打开全自动血凝仪开关,仪器自检成功后,按要求装入试剂、供试品、标准品。注意每次测定时需要检查是否有足够的标准、供试品和试剂。

4 计算

全自动血凝仪依据标准品溶液效价及测定的标准品和供试品溶液凝集时间,自动计算出供试品溶液的效价。其计算方法是以标准品溶液效价的对数对其相应的凝集时间的对数作直线回

归,求得直线回归方程,再根据供试品溶液凝集时间计算出供试品溶液的效价,再乘以稀释倍数,即为供试品人凝血因子Ⅷ效价。

5 结果与判定

5.1 实验成立条件:直线回归系数应不低于 0.98。

5.2 供试品溶液人凝血因子Ⅷ效价乘以溶解体积,为供试品每瓶人凝血因子Ⅷ效价。按照药典要求,应为标示量的 80%~140%。

6 注意事项

6.1 直接与标准品、供试品接触的器皿应为塑料制品或硅化玻璃制品。

6.2 供试品溶液至少测定 2 个稀释度,选择的稀释度的凝集时间应该尽量避免在标准曲线的两端。若供试品的凝集时间超出标准曲线,应弃出,重新选择稀释度进行测定。

起草人:王菁舟 马秋平

复核人:侯继锋

人凝血因子 IX 效价测定法

1 原理

采用一期法原理,即部分凝血活酶试验原理,用人凝血因子 IX 缺乏血浆为基质血浆,通过标准品和供试品纠正 IX 因子缺乏血浆所致的凝固时间进行测定。将稀释已知效价的人凝血因子 IX 国际标准品或国家标准品与 IX 因子缺乏血浆的混合物做部分凝血活酶时间 APTT 测定,建立标准曲线。采用常用的凝固时间统计学方法,将供试品部分凝血活酶时间 APTT 与标准曲线进行比较,从而计算出供试品中人凝血因子 IX 效价。

2 材料和设备

2.1 标准品 人凝血因子 IX WHO 国际标准品或人凝血因子 IX 国家标准品。

2.2 主要耗材 移液管、吸头、离心管、塑料管、反应杯等。

2.3 仪器设备 全自动血凝仪。

2.4 试剂 0.9%氯化钠溶液、3.8%枸橼酸钠溶液、咪唑缓冲液、APTT、氯化钙溶液、乏 IX 因子血浆等。

3 操作方法

3.1 标准曲线 取一支人凝血因子 IX WHO 国际标准品或人凝血因子 IX 国家标准品,平衡至室温后加 1.0ml 注射用水溶解,用 0.9%氯化钠溶液或乏 IX 因子血浆预稀释至 1.0/ml,置冰浴中备用。按照全自动血凝仪操作说明,制作标准曲线。

3.2 供试品 待检的人凝血因子 IX 冻干品平衡室温后,按标示量加注射用水溶解。若供试品含有肝素,先用硫酸鱼精蛋白中和供试品中的肝素,再用 0.9%氯化钠溶液或乏 IX 因子血浆预稀释至 1.0IU/ml,用样品稀释液稀释至相应的浓度(例如 0.5IU/ml、0.25 IU/ml)置冰浴中备用。

3.3 仪器操作 按全自动血凝仪设定的程序进行。打开全自动血凝仪开关,仪器自检成功

后,按要求装入试剂、供试品、标准品。注意每次测定时需要检查是否有足够的标准、供试品和试剂。

4 计算

全自动血凝仪依据标准品溶液效价及测定的标准品和供试品溶液凝集时间,自动计算出供试品溶液的效价。其计算方法是以标准品溶液效价的对数对其相应的凝集时间的对数作直线回归,求得直线回归方程,再根据供试品溶液凝集时间计算出供试品溶液的效价,再乘以稀释倍数,即为供试品人凝血因子IX效价。

5 结果与判定

5.1 实验成立条件:直线回归系数应不低于0.98。

5.2 供试品溶液人凝血因子IX效价乘以溶解体积,为供试品每瓶人凝血因子IX效价。按照2015年版《中国药典》要求,应为标示量的80%~140%。

6 注意事项

6.1 直接与标准品、供试品接触的器皿应为塑料制品或硅化玻璃制品。

6.2 供试品溶液至少测定2个稀释度,选择的稀释度的凝集时间应该尽量避免在标准曲线的两端。若稀释度的凝集时间超出标准曲线,应弃出,重新选择稀释度进行测定。

起草人:王箫舟 马秋平

复核人:侯继锋

人凝血因子II效价测定法

1 原理

采用一期法原理(即含钙凝血酶原测定凝固时间试验原理),用人凝血因子II缺乏血浆为基质血浆,通过标准品和供试品纠正II因子缺乏血浆所致的凝固时间进行测定。将稀释已知效价的人凝血因子II国际标准品或国家标准品与II因子缺乏血浆的混合物做含钙凝血酶原时间(PT)测定,建立标准曲线。采用常用的凝固时间统计学方法,将供试品凝固时间(PT)与标准曲线进行比对,从而计算出供试品中人凝血因子II效价。

2 材料和设备

2.1 标准品 人凝血因子II WHO国际标准品或人凝血因子II国家标准品。

2.2 主要耗材 移液管、吸头、离心管、塑料管、反应杯等。

2.3 仪器设备 全自动血凝仪。

2.4 试剂 0.9%氯化钠溶液、3.8%枸橼酸钠溶液、咪唑缓冲液、PT试剂、氯化钙溶液、乏II因子血浆等。

3 操作方法

3.1 标准曲线 取一支人凝血因子II WHO国际标准品或人凝血因子II国家标准品,平衡

至室温后加 1.0ml 注射用水溶解,用 0.9%氯化钠溶液或乏Ⅱ因子血浆预稀释至 1.0IU/ml,置冰浴中备用。按照全自动血凝仪操作说明,制作标准曲线。

3.2 供试品 待检的人凝血因子Ⅱ冻干品平衡室温后,按标示量加注射用水溶解。再用 0.9%氯化钠溶液或乏Ⅱ因子血浆预稀释至 1.0IU/ml,用样品稀释液稀释至相应的浓度(例如 0.5IU/ml、0.25IU/ml)置冰浴中备用。

3.3 仪器操作 按全自动血凝仪设定的程序进行。打开全自动血凝仪开关,仪器自检成功后,按要求装入试剂、供试品、标准品。注意每次测定时需要检查是否有足够的标准、供试品和试剂。

4 计算

全自动血凝仪标准品溶液效价及测定的标准品和供试品溶液凝集时间,自动计算出供试品溶液的效价。其计算方法是以标准品溶液效价的对数对其相应的凝集时间的对数作直线回归,求得直线回归方程,再根据供试品溶液凝集时间计算出供试品溶液的效价,再乘以稀释倍数,即为供试品人凝血因子Ⅱ效价。

5 结果与判定

5.1 实验成立条件 直线回归系数应不低于 0.98。

5.2 供试品溶液人凝血因子Ⅱ效价乘以溶解体积,为供试品每瓶人凝血因子Ⅱ效价。按照 2015 年版《中国药典》要求,应不低于标示量的 80%。

6 注意事项

6.1 直接与标准品、供试品接触的器皿应为塑料制品或硅化玻璃制品。

6.2 供试品溶液至少测定 2 个稀释度,选择的稀释度的凝集时间应该尽量避免在标准曲线的两端。若稀释度的凝集时间超出标准曲线,应弃出,重新选择稀释度进行测定。

起草人:王菁舟 马秋平
复核人:侯继锋

人凝血因子Ⅶ效价测定法

1 原理

采用一期法原理,即含钙凝血酶原测定凝固时间试验原理,用人凝血因子Ⅶ缺乏血浆为基质血浆,通过标准品和供试品纠正Ⅶ因子缺乏血浆所致的凝固时间进行测定。将稀释已知效价的人凝血因子Ⅶ国际标准品或国家标准品与Ⅶ因子缺乏血浆的混合物做含钙凝血酶原时间(PT)测定,建立标准曲线。采用常用的凝固时间统计学方法,将供试品凝固时间(PT)与标准曲线进行比对,从而计算出供试品中人凝血因子Ⅶ效价。

2 材料和设备

2.1 标准品 人凝血因子Ⅶ WHO 国际标准品或人凝血因子Ⅶ国家标准品。

2.2 主要耗材 移液管、吸头、离心管、塑料管、反应杯等。

2.3 仪器设备 全自动血凝仪。

2.4 试剂 0.9%氯化钠溶液、3.8%枸橼酸钠溶液、咪唑缓冲液、PT 试剂、氯化钙溶液、乏Ⅶ因子血浆等。

3 操作方法

3.1 标准曲线 取一支人凝血因子Ⅶ WHO 国际标准品或人凝血因子Ⅶ国家标准品,平衡至室温后加 1.0ml 注射用水溶解,用 0.9%氯化钠溶液或乏Ⅶ因子血浆预稀释至 1.0IU/ml,置冰浴中备用。按照全自动血凝仪操作说明,制作标准曲线。

3.2 待检样品 待检的人凝血因子Ⅶ冻干品平衡室温后,按标示量加注射用水溶解。再用 0.9%氯化钠溶液或乏Ⅶ因子血浆预稀释至 1.0IU/ml,用样品稀释液稀释至相应的浓度(例如 0.5IU/ml、0.25IU/ml)置冰浴中备用。

3.3 仪器操作 按全自动血凝仪设定的程序进行。打开全自动血凝仪开关,仪器自检成功后,按要求装入试剂、供试品、标准品。注意每次测定时需要检查是否有足够的标准、供试品和试剂。

4 计算

全自动血凝仪依据标准品溶液效价及测定的标准品和供试品溶液凝集时间,自动计算出供试品溶液的效价。其计算方法是标准品溶液效价的对数对其相应的凝集时间的对数作直线回归,求得直线回归方程,再根据供试品溶液凝集时间计算出供试品溶液的效价,再乘以稀释倍数,即为供试品人凝血因子Ⅶ效价。

5 结果与判定

5.1 实验成立条件 直线回归系数应不低于 0.98。

5.2 供试品溶液人凝血因子Ⅶ效价乘以溶解体积,为供试品每瓶人凝血因子Ⅶ效价。按照 2015 年版《中国药典》要求,应不低于标示量的 80%。

6 注意事项

6.1 直接与标准品、供试品接触的器皿应为塑料制品或硅化玻璃制品。

6.2 供试品溶液至少测定 2 个稀释度,选择的稀释度的凝集时间应该尽量避免在标准曲线的两端。若稀释度的凝集时间超出标准曲线,应弃出,重新选择稀释度进行测定。

起草人:王菁舟 马秋平

复核人:侯继锋

人凝血因子 X 效价测定法

1 原理

采用一期法原理(即含钙凝血酶原测定凝固时间试验原理),用人凝血因子 X 缺乏血浆为基质血浆,通过标准品和供试品纠正 X 因子缺乏血浆所致的凝固时间进行测定。将稀释已知效价的人凝血因子 X 国际标准品或国家标准品与 X 因子缺乏血浆的混合物做含钙凝血酶原时间

(PT)测定,建立标准曲线。采用常用的凝固时间统计学方法,将供试品凝固时间(PT)与标准曲线进行比对,从而计算出供试品中人凝血因子X效价。

2 材料和设备

2.1 标准品 人凝血因子X WHO国际标准品或人凝血因子X国家标准品。

2.2 主要耗材 移液管、吸头、离心管、塑料管、反应杯等。

2.3 仪器设备 全自动血凝仪。

2.4 试剂 0.9%氯化钠溶液、3.8%枸橼酸钠溶液、咪唑缓冲液、PT试剂、氯化钙溶液、乏X因子血浆等。

3 操作方法

3.1 标准曲线 取一支人凝血因子X WHO国际标准品或人凝血因子X国家标准品,平衡至室温后加1.0ml注射用水溶解,用0.9%氯化钠溶液或乏X因子血浆预稀释至1.0IU/ml,置冰浴中备用。按照全自动血凝仪操作说明,制作标准曲线。

3.2 待检样品 待检的人凝血因子X冻干品平衡室温后,按标示量加注射用水溶解。再用0.9%氯化钠溶液或乏X因子血浆预稀释至1.0IU/ml,用样品稀释液稀释至相应的浓度(例如0.5IU/ml、0.25IU/ml)置冰浴中备用。

3.3 仪器操作 按全自动血凝仪设定的程序进行。打开全自动血凝仪开关,仪器自检成功后,按要求装入试剂、供试品、标准品。注意每次测定时需要检查是否有足够的标准、供试品和试剂。

4 计算

全自动血凝仪依据标准品溶液效价及测定的标准品和供试品溶液凝集时间,自动计算出供试品溶液的效价。其计算方法是标准品溶液效价的对数对其相应的凝集时间的对数作直线回归,求得直线回归方程,再根据供试品溶液凝集时间计算出供试品溶液的效价,再乘以稀释倍数,即为供试品人凝血因子X效价。

5 结果与判定

5.1 实验成立条件 直线回归系数应不低于0.98。

5.2 供试品溶液人凝血因子X效价乘以溶解体积,为供试品每瓶人凝血因子X效价。按照2015年版《中国药典》要求,应不低于标示量的80%。

6 注意事项

6.1 直接与标准品、供试品接触的器皿应为塑料制品或硅化玻璃制品。

6.2 供试品溶液至少测定2个稀释度,选择的稀释度的凝集时间应该尽量避免在标准曲线的两端。若稀释度的凝集时间超出标准曲线,应弃出,重新选择稀释度进行测定。

起草人:王箐舟 马秋平

复核人:侯继锋

凝固活力测定法

1 原理

纤维蛋白原是纤维蛋白的前体，在凝血的最后阶段，可溶性纤维蛋白原转变成不溶性纤维蛋白，使血液凝固。凝血原理是以凝血酶作用于纤维蛋白原，使其转变为纤维蛋白，发生凝集。纤维蛋白原活力与凝固时间呈负相关。

2 材料和设备

- 2.1 标准品 人凝血酶国家标准品。
- 2.2 耗材 移液管、吸头、离心管、塑料管、反应杯等。
- 2.3 仪器设备 四通道血凝仪，冰箱，加样器，移液器，振荡器等。
- 2.4 主要试剂 0.9%氯化钠溶液。

3 操作方法

- 3.1 人凝血酶国家标准品溶液 取人凝血酶国家标准品 1 支，按标示量加入注射用水复溶，再用 0.9%氯化钠溶液稀释至 3.0IU/ml。
- 3.2 供试品溶液 供试品按标示量加入注射用水复溶后，用生理盐水稀释至 3.0mg/ml。
- 3.3 仪器操作 打开四通道血凝仪，通过使用“箭头”键来选择需要的模式并通过“ENTER”键确认，选择 PTT，并通过“ENTER”键确认。本机将自动进入检测程序，检测通道下方的指示灯也将持续显示为绿色。于四通道血凝杯内加入凝血酶（3.0IU/ml）0.2ml，置四通道血凝仪预热位预热 1 分钟，再加入 0.2ml 人纤维蛋白原溶液 3.0mg/ml，同时启动四通道血凝仪自动记录凝集时间。按下通道下方的数字键，需要在加入反应试剂的同时按下位于检测通道激活按键两端的开始键，开始计时，凝集后仪器自动打印凝集时间。

4 计算

供试品每个稀释度需要平行测定 2 管。取 2 管的凝集时间平均值作为该批供试品凝集时间。

5 结果与判定

供试品的凝固活力应该符合现行版《中国药典》或国家批准的要求时间。

6 注意事项

仪器检测结果的准确性取决于操作者在转移样本和试剂的过程中所选用的移液装置和操作方法。应使用微量移液器进行精确操作。

起草人：王菁舟 马秋平
复核人：侯继锋

凝血酶活性测定法

1 原理

为了防止人凝血酶原复合物临床使用时出现弥散性血管内凝血（DIC）或血栓，需对人凝血酶原复合物制品进行人凝血酶活性测定。根据凝血酶使人纤维蛋白原凝固的原理，将一定量的供试品和纤维蛋白原混合后，在 37℃ 放置 24 小时，观察有无凝块或纤维蛋白析出。放置期间至少观察 2 次，要求不得有凝块或纤维蛋白析出。如果供试品含有肝素，则需先用硫酸鱼精蛋白中和肝素后再测定供试品的人凝血酶活性。

2 材料和设备

- 2.1 标准品 人凝血酶国家标准品。
- 2.2 供试品 按样品肝素含量测定值，用硫酸鱼精蛋白中和样品后测定。
- 2.3 5g/L 纤维蛋白原溶液 取复溶冻干人纤维蛋白原溶液，加 0.9% 氯化钠溶液稀释成 5g/L。
- 2.4 0.9% 氯化钠溶液。
- 2.5 耗材 移液管、吸头、离心管、塑料管、反应杯等。
- 2.6 仪器设备 37℃ 孵箱，冰箱，加样器，移液器，振荡器等。

3 操作方法

- 3.1 测定 取供试品 0.2ml，加 5g/L 纤维蛋白原溶液 0.2ml，37℃ 放置 24 小时，其间至少观察 2 次。测定时应同时做阴性及阳性对照。
- 3.2 阴性对照 取 0.2ml 0.9% 氯化钠溶液，加入 5g/L 纤维蛋白原溶液 0.2ml，37℃ 放置 24 小时，其间至少观察 2 次。
- 3.3 阳性对照 取 0.2ml 0.5IU/ml 凝血酶，加入 5g/L 纤维蛋白原溶液 0.2ml，37℃ 放置 24 小时，其间至少观察 2 次。

附注：含肝素的供试品应根据肝素含量，用适量的硫酸鱼精蛋白中和供试品内的肝素，再取样检查（按 10μg 硫酸鱼精蛋白中和 1IU 肝素进行）。

4 结果与判定

- 4.1 阴性对照和阳性对照均成立。
阴性对照：不得有任何凝块或纤维蛋白出现。
阳性对照：应有凝块或纤维蛋白出现。
- 4.2 供试品不得有任何凝块或纤维蛋白出现。

起草人：马秋平

复核人：侯继锋 王菁舟

肝素含量测定法（凝结法）

1 原理

为预防血栓综合征，人凝血酶原复合物可加入肝素抗凝剂，但每 1IU 人凝血因子的肝素量不超过 0.5IU（人凝血酶原复合物制品以凝血因子 IX 计算肝素限量）。

依据鱼精蛋白能中和抗凝剂肝素，从而影响血浆凝固时间的原理，测定供试品中肝素含量。在已含有缺血小板人血浆的塑料管中加入脑磷脂悬液，37℃ 放置 1 分钟后，加含不同浓度鱼精蛋白的供试品溶液和已预热至 37℃ 的氯化钙，记录凝固时间。取凝固时间最短的供试品管，作为硫酸鱼精蛋白中和 0.5ml 供试品中肝素的量。以 10μg 硫酸鱼精蛋白中和 1IU 肝素计算供试品肝素含量。例如凝固时间最短的供试品管中含鱼精蛋白 30μg，则中和 0.5ml 供试品中肝素量为 3IU，即供试品每 1ml 含 6IU 肝素。

2 材料和设备

2.1 设备 四通道半自动血凝仪、冰箱，加样器，移液器，振荡器等。

2.2 主要试剂

2.2.1 缺血小板血浆 采集全血（9 份全血+1 份灭菌的 3.8%枸橼酸钠抗凝剂），立即混匀，并立即于 4℃、1500r/min 离心 30 分钟，用塑料注射器取上层 2/3 的血浆，立即于 4℃、3500r/min 离心 30 分钟，取上层 2/3 血浆，分装于塑料管中，每支 3ml，保存 -20℃ 以下。

2.2.2 pH 7.5 Tris 缓冲液 称取 7.27g Tris，5.27g NaCl 加蒸馏水溶解，并稀释至 1000ml（用 HCl 调 pH 至 7.5）。

2.2.3 脑磷脂 冻干脑磷脂加注射用水复溶。用 0.9%氯化钠溶液稀释，稀释的脑磷脂浓度应选择空白凝固时间大于 200 秒。

2.2.4 0.025mol/L CaCl₂ 称 147g 氯化钙（CaCl₂·2H₂O）溶于 1000ml 蒸馏水中，配制成 1mol/L 氯化钙贮备液，用前用蒸馏水 40 倍稀释，配制成 0.025mol/L 氯化钙溶液。用前需在 37℃ 水浴预热。

2.2.5 硫酸鱼精蛋白 用 pH 7.5 Tris 缓冲液稀释成不同浓度（0~20g/ml）。

- | | |
|-----------------------------------|----------------------------------|
| (1) 20mg+1ml B (20mg); | (5) 取 (1) 0.1ml+0.025ml B (16mg) |
| (2) 取 (1) 0.1ml+0.0053ml B (19mg) | (6) 取 (1) 0.1ml+0.033ml B (15mg) |
| (3) 取 (1) 0.1ml+0.011ml B (18mg) | (7) 取 (1) 0.1ml+0.043ml B (14mg) |
| (4) 取 (1) 0.1ml+0.0176ml B (17mg) | (8) 取 (1) 0.1ml+0.054ml B (13mg) |
| (9) 取 (1) 0.1ml+0.067ml B (12mg) | (15) 取 (9) 0.1ml+0.1ml B (6mg) |
| (10) 取 (1) 0.1ml+0.082ml B (11mg) | (16) 取 (11) 0.1ml+0.1ml B (5mg) |
| (11) 取 (1) 0.1ml+0.1ml B (10mg) | (17) 取 (13) 0.1ml+0.1ml B (4mg) |
| (12) 取 (3) 0.1ml+0.1ml B (9mg) | (18) 取 (15) 0.1ml+0.1ml B (3mg) |
| (13) 取 (5) 0.1ml+0.1ml B (8mg) | (19) 取 (17) 0.1ml+0.1ml B (2mg) |
| (14) 取 (7) 0.1ml+0.1ml B (7mg) | (20) 取 (19) 0.1ml+0.1ml B (1mg) |

2.2.6 混合物制备 取不同浓度的硫酸鱼精蛋白 20μl 于塑料管中，各加重溶后的待检样品 1.0ml。

2.3 主要耗材 移液管、吸头、离心管、塑料管、反应杯等。

3 操作方法

3.1 空白 取一支塑料管置 37℃ 水浴，加 0.1ml 缺血小板血浆，加 0.1ml 脑磷脂，混匀，37℃ 保温 1 分钟，加 0.1ml pH 7.5 Tris 缓冲液，加 0.1ml 0.025mol/L CaCl₂，立即记录凝固时间。应大于 200 秒，否则需调整脑磷脂稀释度。

3.2 供试品测定 与空白测定相同，仅将 0.1ml pH 7.5 Tris 缓冲液换成制备的混合物即可。

4 计算

不同浓度的硫酸鱼精蛋白存在于混和物中，取凝固时间最短的待检样品管，作为硫酸鱼精蛋白中和 0.5ml 供试品中的肝素量。10μg 硫酸鱼精蛋白中和 1IU 肝素。例如混合物中每毫升含 30μg 硫酸鱼精蛋白，中和 0.5ml 供试品中的肝素量则为 3IU，即每毫升供试品含 6IU 肝素。

5 结果与判定

判定标准执行 2015 年版《中国药典》三部要求，1IU 人凝血因子的肝素量不超过 0.5IU。

6 注意事项

直接与血和血浆接触的器具应为塑料或硅化的玻璃制品。从供试品稀释到测定完毕应在 30 分钟内完成。

起草人：马秋平

复核人：侯继锋 王箬舟

活化的凝血因子活性检查法

1 原理

人凝血酶原复合物中如含有活化的凝血因子则有潜在的引起 DIC（弥散性血管内凝血）或出现血栓的可能性。原理是依据活化的凝血因子在脑磷脂存在条件下，使缺血小板入血浆凝固的原理，将供试品和缺血小板血浆及脑磷脂、钙离子混合后，在 37℃ 放置，测定凝固时间，根据凝固时间判定供试品是否含有活化的凝血因子，要求凝固时间应不低于 150 秒。

2 材料和设备

2.1 耗材 移液管、吸头、离心管、塑料管、反应杯等。

2.2 仪器设备 四通道凝集仪，冰箱，加样器，移液器，振荡器等。

2.3 主要试剂

2.3.1 缺血小板血浆 采集全血（9 份全血+1 份灭菌的 3.8%枸橼酸钠抗凝剂），立即混匀，并立即于 4℃、1500r/min 离心 30 分钟，用塑料注射器取上层 2/3 的血浆，立即于 4℃、3500r/min 离心 30 分钟，取上层 2/3 血浆，分装于塑料管中，每支 3ml，保存 -20℃ 以下。

2.3.2 pH 7.5 Tris 缓冲液（B）称取 7.27g Tris，5.27g NaCl 加蒸馏水溶解，并稀释至 1000ml（用 HCl 调 pH 至 7.5）。

2.3.3 脑磷脂 冻干脑磷脂加注射用水复溶。用氯化钠注射液稀释，稀释的脑磷脂浓度应选择空白凝固时间大于 200 秒。

2.3.4 0.025mol/L CaCl₂ 称取 147g 氯化钙 (CaCl₂ · 2H₂O) 溶于 1000ml 蒸馏水中，配制成 1mol/L 氯化钙贮备液，用前用蒸馏水 40 倍稀释，配制成 0.025mol/L 氯化钙溶液。用前需在 37℃ 水浴预热。

2.3.5 硫酸鱼精蛋白 用 pH 7.5 Tris 缓冲液稀释成不同浓度 (0~20g/ml)，稀释方法：

- | | |
|-----------------------------------|----------------------------------|
| (1) 20mg+1ml B (20mg)； | (5) 取 (1) 0.1ml+0.025ml B (16mg) |
| (2) 取 (1) 0.1ml+0.0053ml B (19mg) | (6) 取 (1) 0.1ml+0.033ml B (15mg) |
| (3) 取 (1) 0.1ml+0.011ml B (18mg) | (7) 取 (1) 0.1ml+0.043ml B (14mg) |
| (4) 取 (1) 0.1ml+0.0176ml B (17mg) | (8) 取 (1) 0.1ml+0.054ml B (13mg) |
| (9) 取 (1) 0.1ml+0.067ml B (12mg) | (15) 取 (9) 0.1ml+0.1ml B (6mg) |
| (10) 取 (1) 0.1ml+0.082ml B (11mg) | (16) 取 (11) 0.1ml+0.1ml B (5mg) |
| (11) 取 (1) 0.1ml+0.1ml B (10mg) | (17) 取 (13) 0.1ml+0.1ml B (4mg) |
| (12) 取 (3) 0.1ml+0.1ml B (9mg) | (18) 取 (15) 0.1ml+0.1ml B (3mg) |
| (13) 取 (5) 0.1ml+0.1ml B (8mg) | (19) 取 (17) 0.1ml+0.1ml B (2mg) |
| (14) 取 (7) 0.1ml+0.1ml B (7mg) | (20) 取 (19) 0.1ml+0.1ml B (1mg) |

3 操作方法

3.1 空白 取一支塑料管置 37℃ 水浴，加 0.1ml 缺血小板血浆，加 0.1ml 脑磷脂，混匀，37℃ 保温 1 分钟，加 0.1ml pH 7.5 Tris 缓冲液，加 0.1ml 0.025mol/L CaCl₂，立即记录凝固时间。应大于 200 秒，否则需调整脑磷脂稀释度。

3.2 供试品测定 与空白测定相同，仅将 0.1ml pH 7.5 Tris 缓冲液换成 1:10 和 1:100 待检样品稀释液即可。每个稀释度作 2 管。

4 结果与判定

1:10 和 1:100 供试品稀释液凝固时间应大于 150 秒。

5 注意事项

直接与血和血浆接触的器具应为塑料或硅化的玻璃制品。从供试品稀释到测定完毕应在 30 分钟内完成。

起草人：马秋平

复核人：侯继锋 王菁舟

枸橼酸离子含量测定法

1 原理

枸橼酸离子能与血中钙离子形成难以解离的可溶性络合物枸橼酸钙，该络合物易溶于水但不易解离，使血中钙离子减少，钙离子是凝血过程中所需的物质之一，血液中钙离子减少将会使血液凝固受阻，故需限制并测定血液制品中枸橼酸离子的含量。

原理是采用高效液相色谱连接示差检测器，以苯乙烯-二乙烯基苯共聚物为填料的离子交换色谱柱进行枸橼酸离子含量的定量测定。

2 材料和设备

2.1 高效液相系统

2.1.1 高效液相。

2.1.2 示差检测器。

2.1.3 色谱软件管理系统。

2.1.4 高效液相色谱柱：离子交换色谱柱（ H^+ ），内径 7.8mm，柱长 300mm。

2.1.5 样品过滤器（13mmID，0.45 μm ）。

2.2 试剂

2.2.1 25mmol/L 枸橼酸钠标准贮备液 准确称取经减压干燥至恒重的枸橼酸钠（分析纯， $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$ ，分子量：294.1）0.735g，用超纯水溶解定容至 100ml。

2.2.2 枸橼酸钠标准工作液 精密量取 5.0ml、10.0ml、15.0ml，分别置 25ml 量瓶中，用水稀释置刻度，摇匀即得相对应的 5.0mmol/L、10.0mmol/L、15.0mmol/L 枸橼酸离子标准工作溶液。

2.2.3 流动相：0.004mol/L 的硫酸溶液 取 0.24ml 的浓硫酸（分析纯）用超纯水稀释至 1000ml，使用前用 0.45 μm 滤膜过滤。

2.2.4 1.5%磺基水杨酸 称取 7.5g 磺基水杨酸（分析纯）溶于超纯水并定容至 500ml。

3 操作方法

3.1 色谱条件

3.1.1 示差检测器折光指数量程： 4×10^6 。

3.1.2 流速：0.8ml/min。

3.2 供试品处理 冻干制品应首先按照标示量或规定值进行溶解，混匀。取 1.0ml 供试品于 15ml 离心管中，加入 1.0ml 的 1.5%磺基水杨酸，混匀。室温下静置 2 小时后，3000r/min 离心 10 分钟。取上清液用 0.45 μm 滤器过滤后备用。依据供试品的蛋白含量不同，沉淀剂的加样量可以做适当调整。

3.3 系统适用性检测 准确取 2%麦芽糖标准溶液 1.0ml，准确加 1.5%磺基水杨酸 1.0ml 混匀制成 1%麦芽糖混合液，系统平衡基线稳定后进 20 μl 注入色谱柱记录谱图，麦芽糖与磺基水杨酸两峰之间的分离度（R），拖尾因子（T）按麦芽糖峰计算均应符合现行版药典规定。

3.4 测定 分别进 5.0mmol/L、10.0mmol/L、15.0mmol/L 三个浓度的枸橼酸离子对照溶液各 0.02ml，供试品进样量为 0.02ml。

4 计算

以峰面积对标准液枸橼酸离子含量进行直线回归，求得直线回归方程。将供试品峰面积代入回归方程算出枸橼酸离子含量（A）。

$$\text{供试品枸橼酸含量 (mmol/L)} = \text{枸橼酸离子含量 A} \times \text{稀释倍数}$$

5 结果与判定

标准曲线相关系数(R)应不低于0.999。磺基水杨酸、麦芽糖两峰之间的分离度R,拖尾因子(T)按麦芽糖峰计算均应符合现行版《中国药典》的规定。

6 注意事项

根据供试品中枸橼酸离子含量的不同,对照品溶液的进样量或者浓度可以做相应的调整,稀释倍数可以相应调整。

起草人:王敏力 赵卉

复核人:侯继锋 王菁舟

磷酸三丁酯残留量测定法

1 原理

凝血因子制品的病毒灭活方法之一是通常采用S/D处理。S/D组合通常是指0.3%磷酸三丁酯与1%吐温80。磷酸三丁酯对人体有毒副作用,在病毒灭活工艺完成后需对色谱柱进行充分洗涤,去除病毒灭活工艺中引入的磷酸三丁酯。采用气相色谱方法,用磷酸三丙酯作内标测定供试品中磷酸三丁酯残留量。用DB-FFAP毛细管柱,氮磷检测器。磷酸三丁酯与磷酸三丙酯峰的分离度应不小于1.5,磷酸三丁酯与磷酸三丙酯峰面积之比的相对标准差应不大于5%。以磷酸三丁酯对照品峰面积与内标峰面积比,对磷酸三丁酯对照品溶液浓度作直线回归,计算出供试品中磷酸三丁酯含量。

2 材料和设备

2.1 仪器 气相色谱仪配备氮磷检测器。

2.2 色谱柱 DB-FFAP毛细管柱或等效的毛细管柱。

2.3 试剂 正己烷、600 μ g/ml磷酸三丁酯(TNBP)标准工作液、400 μ g/ml磷酸三丙酯(TPP)内标工作液、1.5mol/L高氯酸溶液。

3 操作方法

3.1 标准曲线 取具塞玻璃离心管5支,每支加3ml蒸馏水,分别加4.1.3项的TNBP标准工作液10、20、40、60、80 μ l,组成5个标准管。每管加入50 μ l内标工作液,1.5mol/L高氯酸溶液0.75ml,振荡1分钟,加盖,37 $^{\circ}$ C水浴保温10分钟。取出,每管加入4ml正己烷,振荡2分钟,每分钟2000转离心20分钟,以去除乳化;在不干扰界面情况下,吸取有机相(上层正己烷),进行气相色谱测定。

3.2 供试品测定 取3ml样品于离心管中,每管加入50 μ l TPP内标工作液。以下操作同5.3.1项。

4 计算

4.1 根据各管标准的TNBP对TPP峰面积比,对各管中TNBP浓度进行回归统计,即可

得回归方程。线性相关系数应 ≥ 0.99 。

4.2 根据供试品 TNBP 对 TPP 的峰面积比代入回归方程即得 TNBP 含量。

5 结果与判定

判定标准执行 2015 年版《中国药典》三部要求， $\leq 10\mu\text{g/ml}$ 。

6 注意事项

- 6.1 所有标准及供试品溶剂挥发的速度应尽量保持一致。
- 6.2 若离心后，乳化仍未完全破除，可在振荡器上稍微振摇一下，再离心一次。

起草人：马秋平 王芳舟

复核人：侯继锋

聚山梨醇 80 残留量测定法

1 原理

聚山梨酯 80 系油酸山梨坦和环氧乙烷聚合而成的聚氧乙烯 20 油酸山梨坦，在水、乙醇、甲醇或乙酸乙酯中易溶解，在矿物油中极微溶解。本品相对密度为 1.06~1.09，运动黏度在 25℃ 时（毛细管内径为 2.0~2.5mm）为 350~550mm²/s（其供注射用其值为 350~450mm²/s），酸值不得超过 2.0（其供注射用其值不得超过 1.0），皂化值为 45~55，羟值为 65~80，碘值为 18~24，过氧化值不得超过 10（其供注射用其值不得超过 3）。聚山梨酯 80 残留量法系依据聚山梨酯中的聚乙氧基和钼钴硫氰酸盐反应生成蓝色复合物，可溶于二氯甲烷，用比色法测定聚山梨酯 80 含量。本法系采用紫外分光测定方法，检测血液制品聚山梨酯 80（Tween 80）的含量。

2 材料和设备

- 2.1 95%乙醇-氯化钠溶液：95%乙醇（AR）加氯化钠至饱和。
- 2.2 硫氰钴铵溶液：称取 6.0g 硝酸钴和 40.0g 硫氰酸铵，用蒸馏水溶解至 200ml。
- 2.3 二氯甲烷：分析纯。
- 2.4 聚山梨酯 80 储备液：精密称取 0.1g 聚山梨酯 80，用蒸馏水溶解，定容至 100ml。
- 2.5 紫外分光光度计。

3 操作方法

3.1 标准曲线 于每管加 1ml 蒸馏水的 12 支离心管中，分别加入聚山梨酯 80 储备液 0 μl 、25 μl 、50 μl 、100 μl 、200 μl ，混匀（使聚山梨酯 80 浓度在 0~300 $\mu\text{g/ml}$ ）。每一浓度作二管，每管准确加 3.0ml 硫氰钴铵溶液，2.0ml 二氯甲烷，盖紧塞，混匀，室温放置 1.5 小时，每 15 分钟振荡 1 次，测定前放置 0.5 小时后吸去上层液，测定下层的二氯甲烷 A 值。

3.2 供试品 取 1.0ml 待检样品加入离心管，加 5ml 95%乙醇-氯化钠溶液，转动摇匀，离心，将上清液轻轻倒入离心管，用 1.0ml 95%乙醇-氯化钠溶轻轻洗沉淀，洗液倒入上述离心管，离心去蛋白，上清液置 55~70℃ 水浴中，用空气吹溶液至 0.1~0.5ml，加 1ml 水溶解。准确加入 3.0ml 硫氰钴铵溶液，2.0ml 二氯甲烷，盖紧塞，混匀，室温放置 1.5 小时，每 15 分钟

振荡 1 次，测定前放置半小时后吸去上层液，测定下层的二氯甲烷 A 值。

3.3 测定：用 620nm 波长测定标准和待检样品 A 值，用二氯甲烷调零点。

4 结果计算

用标准聚山梨酯 80 浓度 ($\mu\text{g/ml}$) 对 A 值进行直线回归，获得回归方程。线性相关系数应不低于 0.98，将供试品 A 值代入回归方程即得聚山梨酯 80 含量 ($\mu\text{g/ml}$)。

5 注意事项

硫氰酸铵按毒品管理。

起草人：郝杰 周倩

复核人：侯继锋 王菁舟

抗血清制品

概述

抗血清类制品，系指用毒素、类毒素、细菌、病毒或其他特异性抗原免疫动物后，采集其高效价血浆，经提取加工纯化后制备的免疫球蛋白制品，使用后可使人体迅速获得其中所含的特异性抗体，即产生被动免疫，一般用于某些特异性疾病（如破伤风）或中毒（如毒蛇咬伤）的早期治疗和预防。

马是最主要用来制备抗血清的动物，我国的市售抗血清制品均为马源性。其他动物，如牛、羊、骆驼等在国外也有使用。抗血清的种类较多，《中国药典》收录的品种有：白喉抗毒素、破伤风抗毒素、肉毒抗毒素、气性坏疽抗毒素（威氏、水肿、溶组织、脓毒）、抗蛇毒血清（蝮蛇、银环蛇、五步蛇、眼镜蛇）、抗炭疽血清和抗狂犬病血清。另外抗蝎毒血清、抗蜘蛛毒血清、抗水母毒血清，以及部分其他品种抗蛇毒血清等在其他国家和地区也有上市。

抗血清的生产分为原料血浆制备和成品制备两个阶段。原料血浆阶段包括马匹免疫、采血和血浆分离等工序，其中马匹免疫又分为基础免疫和加强免疫两个阶段。免疫成功的马匹可进行采血和血浆分离，一般在数日内完成。在成品制备阶段，以马血浆作为起始原材料，包括酶解、热处理、回收、提纯和浓缩等工序，主要的提纯工艺包括盐析、吸附、压滤、超滤和柱层析等。整个生产过程需遵循 GMP 规范，在严格控制的条件下进行。

抗血清是最早诞生的生物制品之一，与其他生物制品相比，其成本低廉、生产工艺简单，时至今日，在多个方面抗血清仍具有无可替代的优势，例如毒蛇咬伤等。但是，抗血清作为动物源性异种蛋白，有容易引起过敏反应的风险。制品中残留的免疫球蛋白 Fc 片段是引起过敏反应的主要原因，因此现代抗血清生产多采用胃酶消化的方法以去除 Fc 片段，而保留具有中和活性的 $F(ab')_2$ 片段作为有效成分，再辅以高效的纯化手段，已使得抗血清的过敏反应风险大为降低。

不同种类抗血清的质量控制要点基本相同，只是在有效性控制（效价检验）方面有所区别。

在不同的生产阶段，抗血清制品的检定内容有所区别，其中原液检定主要包括无菌检查、热原检查和效价测定，半成品一般仅进行无菌检查，成品的检定项目可归纳为 6 个方面：①鉴别试验，包括特异性抗原鉴别试验和动物种属鉴别试验；②物理检查，包括外观、渗透压摩尔浓度和装量；③化学检查，包括 pH 值、蛋白质含量、氯化钠含量、硫酸铵含量、防腐剂含量、甲苯残留量（如生产工艺中有甲苯添加）和稳定剂含量（如使用）等，冻干制剂还应检测水分；④纯度，包括白蛋白检查、 $F(ab')_2$ 和 IgG 含量和分子大小分布检查等，是反映制品质量优劣的关键指标之一；⑤抗体效价，反映制品有效性的关键指标，不同品种抗血清均需测定抗体效价，部分品种还需计算比活性；⑥安全性，包括无菌检查、热原检查和异常毒性检查（小鼠、豚鼠）等。随着抗血清制造工艺的不断进步和质量控制要求的不断提高，其检定项目也随之不断调整和完善。

鉴别试验

抗血清制品的鉴别试验包括两部分，一是通过动物中和试验（即效价试验）或特异沉淀反应，证明其含有特异性免疫球蛋白成分，可中和特异性抗原或与抗原发生特异性免疫反应；二是采用酶联免疫法或免疫双扩散法，证明其为马源性制剂，而非其他动物来源。

第一法：动物中和试验

参见抗体效价部分。

第二法：酶联免疫法

1 原理

将供试品、阳性对照（马 IgG）和阴性对照（人、猪、牛、羊 IgG）包被在酶标板上，与 HRP 标记的兔抗马 IgG 发生反应，在 TMB 等底物作用下显色，供试品和阳性对照均呈阳性反应，而阴性对照呈阴性反应，以此证明供试品为马源性。

2 材料和设备

2.1 仪器与设备 37℃温箱、酶标仪。

2.2 试剂

2.2.1 包被液（pH 9.6 碳酸盐缓冲液）：称取碳酸钠 0.32g、碳酸氢钠 0.586g，加水溶解并稀释至 200ml。

2.2.2 PBS 缓冲液（pH7.4）。

2.2.3 洗涤液（PBS - Tween20）：取 PBS 缓冲液 1000ml，加入 Tween 20 0.5ml。

2.2.4 封闭液：称取牛血清白蛋白 1.0g，加 PBS 缓冲液溶解，并稀释至 100ml。

2.2.5 抗体稀释液：称取牛血清白蛋白 0.5g，加 PBS 缓冲液溶解，并稀释至 100ml。

2.2.6 底物：3,3',5,5' - 四甲基联苯胺（TMB）或其他适宜底物。

2.2.7 终止液：2mol/L 硫酸溶液。

2.2.8 阴性对照：人 IgG、牛 IgG、羊 IgG 和猪 IgG。

2.2.9 阳性对照：马 IgG。

3 操作方法

3.1 供试品和对照品的稀释：用包被液将供试品、阴性对照和阳性对照稀释至蛋白浓度 5~10μg/ml。

3.2 取供试品及对照品稀释液，分别以 100μl/孔加至酶标板内，供试品溶液及对照品溶液均做双孔，用封口膜封好，2~8℃放置 16~20 小时。

3.3 用洗涤液洗板 3 次；用封闭液以 200μl/孔加至酶标板内，用封口膜封好，37℃放置 1 小时。

3.4 将封闭好的酶标板用洗涤液洗板 3 次；用稀释液按 1:2000 稀释辣根过氧化物酶标记的兔抗马 IgG 抗体，以 100μl/孔加至酶标板内，用封口膜封好，37℃放置 1 小时。

3.5 用洗涤液洗板 6 次；以 100μl/孔加入底物液，室温避光放置 5~15 分钟；以 50μl/孔加入终止液终止反应。

3.6 用酶标仪在适宜波长处测定吸光度。

4 结果判定

取4种阴性对照中吸光度最高的种类计算临界值,临界值为阴性对照吸光度(2孔平均值)的2.1倍,阳性对照的吸光度大于临界值则试验成立,供试品吸光度大于临界值时为阳性,表示供试品与马IgG同源。

5 注意事项

- 5.1 包被抗原和酶标二抗的浓度可根据实际情况进行优化。
- 5.2 阴性对照孔OD值一般不要超过0.3。
- 5.3 根据显色底物选择合适的波长,如TMB为450nm,OPD为570nm。

起草人:张华捷

复核人:马霄

硫酸铵测定法

1 原理

本法系依据硫酸铵被氢氧化钠分解释放出氨,并被硼酸吸收生成硼酸铵,用酸滴定液滴定。根据酸滴定液的消耗量可计算出供试品中硫酸铵含量。

2 材料和设备

- 2.1 试剂 供试品,蒸馏水,钨酸钠,硫酸(分析纯)。
- 2.2 材料 量筒,滴定管。
- 2.3 设备 凯氏蒸馏器。

3 操作方法

3.1 供试品溶液的制备 取供试品2ml,加蒸馏水14ml,10%钨酸钠溶液2ml,0.33mol/L硫酸溶液2ml,摇匀,静置30分钟,过滤,留存滤液。

3.2 测定法 精密量取除蛋白滤液10ml,置凯氏蒸馏器内,加4%氢氧化钠溶液1ml,加少量水,参见氮测定法进行蒸馏、滴定,并将滴定的结果用空白对照进行校正。

4 计算

$$\text{硫酸铵含量}(\%) = (V_1 - V_0) \times c \times 14.01 \times 4.715 \times 2 \times 100 / 1000$$

式中 V_1 为供试品消耗硫酸滴定液的体积,ml; V_0 为空白对照消耗硫酸滴定液的体积,ml; c 为硫酸滴定液的浓度, mol/L; 4.715 为常数(1g氮相当于4.715g硫酸铵); 14.01 为氮的相对原子质量。

5 结果与判定

将计算获得的供试品硫酸铵含量与经批准的产品质量标准进行比较,若符合产品质量标准

中硫酸铵含量要求，则判定为合格。

6 注意事项

参见氮测定法

起草人：杨英超

复核人：马霄

间甲酚含量测定法

抗血清成品中如添加间甲酚防腐剂，需检测间甲酚含量。

1 原理

4-氨基安替比林、铁氰化钾与间甲酚反应产生红色物质，其吸光度与间甲酚浓度成正比，用已知不同浓度的间甲酚标准品制备标准曲线，将待检品的吸光度值代入标准曲线，可计算出待检品的间甲酚含量。

2 材料和设备

2.1 仪器与设备 紫外-可见分光光度计，比色皿，量瓶，试管。

2.2 试剂

2.2.1 间甲酚标准液（10mg/ml）：取 100mg 间甲酚，加蒸馏水定容至 10ml，置于棕色玻璃瓶中，4℃避光保存，有效期 1 个月。

2.2.2 pH 9.8 碱性缓冲液：称取无水碳酸钠 6.36g、碳酸氢钠 3.36g、加蒸馏水 800ml 溶解，用 1mol/L 盐酸调 pH 值至 9.8，再加蒸馏水至 1000ml。置于玻璃瓶中，4℃保存，有效期 6 个月。

2.2.3 4-氨基安替比林溶液：称取 4-氨基安替比林 3.0g，加蒸馏水溶解至 1000ml。置于玻璃瓶中，4℃保存，有效期 6 个月。

2.2.4 铁氰化钾溶液：称取铁氰化钾 12.0g，加蒸馏水溶解至 1000ml。置于玻璃瓶中，4℃保存，有效期 6 个月。

2.2.5 磷酸二氢钾溶液：称取磷酸二氢钾 136g，加蒸馏水溶解至 1000ml。置于玻璃瓶中，4℃保存，有效期 6 个月。

3 操作方法

3.1 供试品处理 精确量取一定体积供试品于试管中，用蒸馏水稀释 50 倍。另取一试管，加入稀释后的供试品 1.0ml，加蒸馏水 5.0ml，混匀，再分别加入 pH 9.8 碱性缓冲液、4-氨基安替比林溶液、铁氰化钾溶液及磷酸二氢钾溶液各 1.0ml，摇匀，于室温避光放置 10 分钟。

3.2 标准曲线的制备 精确量取间甲酚标准液（10mg/ml）0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0ml，分别置于试管中，补加蒸馏水至终体积为 6.0ml，其余操作同供试品处理，以 0 管为空白对照。

3.3 测定 打开紫外-可见分光光度计，设定波长 510nm，分别将各浓度间甲酚标准品溶液和供试品的反应液加入比色皿，读取吸光度值。

4 计算结果

分别以间甲酚标准品溶液的浓度及其相应的吸光度为横纵坐标,进行直线回归,将供试品溶液的吸光度代入直线回归方程,计算供试品中的间甲酚含量。

$$\text{间甲酚含量 (g/L)} = \text{经标准曲线计算结果} \times \text{稀释倍数} \div 1000$$

5 注意事项

- 5.1 标准曲线的回归系数 (R^2) 应不低于 0.98。
- 5.2 所有试剂应达到分析纯级别。
- 5.3 所有供试品和各浓度标准品重复测定 2 次,取均值。
- 5.4 比色操作应尽可能迅速完成,因所生成的红色物质在光照条件下,随时间延长其吸光度可能发生变化。

起草人:张华捷

复核人:马霄

甲苯残留量测定法

部分抗血清制品的生产工艺中,在胃酶消化阶段使用了甲苯,那么在成品中还需进行甲苯残留量检测。

1 原理

本法采用气相色谱法,气体作为流动相(载气)流经装有填充剂的色谱柱进行分离测定,物质或其衍生物气化后,被载气带入色谱柱进行分离,各组分先后进入检测器,用数据处理系统记录色谱信号。通过已知甲苯标准品溶液的浓度对应相应的峰面积得到标准曲线,测定供试品中的甲苯残留量。

2 材料和设备

2.1 溶液和试剂

2.1.1 甲苯(色谱级),二硫化碳(色谱级)。

2.1.2 甲苯对照品制备:精密称取一定量甲苯,用二硫化碳溶解,在量瓶中定容,摇匀,再用二硫化碳进一步稀释成 5 个稀释度,用于制备标准曲线。

2.1.3 供试品处理:精密量取供试品 1ml,加二硫化碳 1ml,涡漩振荡后每分钟 8000 转离心 6 分钟,上清液用 0.45 μm 滤膜滤过,加入进样小瓶,准备进样。

2.2 设备 高效气相色谱仪(配制火焰离子化监测器,顶空进样器),氮气,氢气,毛细管色谱柱,离心机,天平,量筒,量瓶。

3 操作方法

3.1 进样及色谱条件 采用顶空进样法,炉温 100 $^{\circ}\text{C}$,平衡 40 分钟,定量环 100 $^{\circ}\text{C}$,传输线 150 $^{\circ}\text{C}$,进样体积 1 μl ,进样口温度为 250 $^{\circ}\text{C}$;检测器温度为 300 $^{\circ}\text{C}$;柱温 55 $^{\circ}\text{C}$;载气流速 1.0ml/min,分流比 10:1,采集时间 7 分钟。

3.2 系统适用性试验 取一定浓度对照品溶液,在已确定的色谱条件下重复测定6次甲苯的峰面积,计算峰面积的相对标准差(RSD),应不大于5%。甲苯的色谱峰与前组分色谱峰之间分离度应大于1.5,拖尾因子为0.95~1.20,理论板数不低于5000。

3.3 测定法 将供试品及不同浓度对照品置于进样小瓶中,各吸取1 μ l注入气相色谱仪,记录保留时间和峰面积。

4 计算

以对照品峰面积(Y)为横坐标,对照品浓度(X)为纵坐标,进行线性回归(r^2 应不低于0.98),求得回归方程。随后,将供试品获得的相应峰面积带入回归方程,从而获得供试品中甲苯的残留量数值。

5 结果与判定

将计算获得的供试品甲苯残留量与经批准的产品质量标准进行比较,若符合产品质量标准中甲苯残留量要求,则判定为合格。

6 注意事项

- 6.1 气相色谱系统的使用和维护应符合相关规定。
- 6.2 供试品和甲苯标准品的处理除二硫化碳外,也可使用其他适宜溶剂。
- 6.3 顶空进样器的进样条件和气相色谱条件可根据实际情况进行优化。

起草人:张华捷

复核人:马霄

白蛋白检查法

1 原理

蛋白质在碱性条件下带不同量的负电荷,在电场中由阴极向阳极泳动,可通过琼脂糖凝胶电泳进行分离。

2 材料和设备

2.1 仪器与设备:电泳仪、直流电源。

2.2 试剂

2.2.1 巴比妥缓冲液(pH 8.6):取4.14g巴比妥,23.18g巴比妥钠,加蒸馏水至1500ml。

2.2.2 1.5%琼脂糖:取琼脂糖1.5g,加水50ml和巴比妥缓冲液(pH 8.6)50ml,加热使完全溶胀。

2.2.3 1%白蛋白溶液:取0.01g白蛋白,加蒸馏水至1ml。

2.2.4 0.5%氨基黑溶液:取氨基黑10B 0.5g,溶于甲醇50ml、冰醋酸10ml及水40ml的混合液中。

2.2.5 脱色液:取乙醇45ml、冰醋酸5ml与水50ml,混匀。

2.2.6 溴酚蓝指示液：取溴酚蓝 50mg，加水溶解，稀释至 100ml。

3 操作方法

3.1 供试品制备 取一定量供试品，加适量巴比妥缓冲液将供试品稀释至约 1% 蛋白浓度，备用。

3.2 琼脂糖凝胶制备 取上述 1.5% 的琼脂糖溶液，趁热将胶液涂布于大小适宜的水平玻璃板上，厚度约 3mm，静置，待凝胶凝固。

3.3 点样 在电泳槽内加入巴比妥缓冲液，于琼脂糖凝胶板负极端的 1/3 处打孔，孔径 2~3mm，置于电泳槽架上，经 3 层滤纸搭桥与巴比妥缓冲液接触。测定孔加适量供试品溶液和 1 滴溴酚蓝指示液，对照孔加适量对照品及 1 滴溴酚蓝指示液。

3.4 电泳 接通电源，100V 恒压条件下电泳 2 小时（指示剂迁移到前沿），关闭电源。

3.5 染色与脱色 取下凝胶板，用 0.5% 氨基黑溶液染色，再用脱色液脱色至背景无色。

4 结果判定

以白蛋白为对照，供试品应不含或仅含痕量白蛋白迁移率的蛋白质成分。

5 注意事项

5.1 所有试剂应达到分析纯级别。

5.2 电泳缓冲液应定期更换，否则可能影响电泳效果。

起草人：张华捷

复核人：马霄

F(ab')₂ 和 IgG 含量 (SDS-PAGE 法) 测定法

1 原理

SDS 带有大量的负电荷，在 SDS-蛋白复合物中，蛋白质所带电荷量可忽略不计，因此，SDS-蛋白复合物在 SDS-PAGE 凝胶电场中的迁移率完全取决于蛋白质的相对分子质量（速度与相对分子质量成反比）而不受其所带电荷的影响，不同相对分子质量的蛋白质经电泳后将位于凝胶的不同区段而得到分离。

2 材料和设备

2.1 仪器与设备 恒压或恒流电源、垂直板电泳槽和制胶模具、预制电泳胶（如使用则无需制胶）和电泳缓冲液。

2.2 试剂

2.2.1 水（电阻率不低于 $18.2\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$ ）。

2.2.2 A 液：1.5mol/L 三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液：称取三羟甲基氨基甲烷 18.15g，加适量水溶解，用盐酸调 pH 值至 8.8，加水稀释至 100ml。

2.2.3 B 液：30% 丙烯酰胺-0.8% N, N'-甲叉双丙烯酰胺溶液（避光保存）。

2.2.4 C液：1%十二烷基硫酸钠溶液。

2.2.5 D液：10%四甲基乙二胺溶液。

2.2.6 E液：10%过硫酸铵溶液，临用前配制。

2.2.7 F液：0.5mol/L 三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液（称取三羟甲基氨基甲烷 6.05g，加适量水溶解，用盐酸调 pH 值至 6.8，加水稀释至 100ml）。

2.2.8 电极缓冲液：称取三羟甲基氨基甲烷 3g、甘氨酸 14.4g、十二烷基硫酸钠 1g，加适量水溶解，用盐酸调 pH 值至 8.3，加水稀释至 1000ml。

2.2.9 供试品缓冲液：称取三羟甲基氨基甲烷 0.303g、溴酚蓝 2mg、十二烷基硫酸钠 0.8g，量取盐酸 0.189ml，甘油 4ml，加水溶解并稀释至 10ml，此溶液用于非还原 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳，如用于还原 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳，则再加 β -巯基乙醇 2ml。

2.2.10 考马斯亮蓝染色液：称取考马斯亮蓝 R250 1g，加入甲醇 200ml、冰醋酸 50ml，水 250ml 混匀。

2.2.11 考马斯亮蓝脱色液：取甲醇 400ml、冰醋酸 100ml 与水 500ml 混匀。

3 操作方法

3.1 分离胶溶液的制备 按下表制成分离胶溶液，灌入模具内至一定高度，加水封顶，室温下聚合（室温不同，聚合时间不同）。

凝胶种类	分离胶溶液						浓缩胶溶液	
	凝胶浓度	5%	7.5%	10%	12.5%	15%		17.5%
A液	4	4	4	4	4	4		
B液	2.7	4	5.4	6.7	8	9.4	1.35	
C液	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	0.9	
D液	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.07	
E液	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.07	
F液	—	—	—	—	—	—	2.25	
H ₂ O	7.3	6	4.88	3.3	2.28	0.88	4.33	

3.2 浓缩胶溶液的制备 待分离胶溶液聚合后，用滤纸吸去上面的水层，再灌入浓缩胶溶液，插入样品梳，注意避免气泡出现。

3.3 供试品溶液的制备 将供试品用供试品缓冲液适当稀释，100℃水浴加热 3~5 分钟。

3.4 加样 待浓缩胶溶液聚合后小心拔出样品梳，将电极缓冲液注满电泳槽前后槽，在供试品孔中加入供试品溶液约 25 μ g。

3.5 电泳 接通电源、冷凝水，以恒流 10mA 条件下开始电泳，至供试品溶液进入分离胶后将电流调至 20mA，直至电泳结束。

3.6 染色 考马斯亮蓝法，将电泳后的凝胶浸入染色液中过夜取出，浸入脱色液中，直至凝胶底色几乎无色，取出凝胶保存在水中。

3.7 结果分析 非还原电泳凝胶经扫描进行纯度分析。

4 结果判定

供试品的 $F(ab')_2$ 和 IgG 含量应符合相应的质量标准。

5 注意事项

5.1 可以使用商品化的预制电泳胶和电泳缓冲液,但电泳条件需根据厂家说明和实际情况进行优化。

5.2 电泳缓冲液需定期更换,否则可能影响电泳效果。

起草人:张华捷

复核人:马霄

分子大小分布测定法 (SEC-HPLC 法)

1 原理

分子排阻高压液相色谱法 (SEC-HPLC) 是一种根据样品分子尺寸进行分离的色谱技术。色谱柱的填料是一种表面惰性,含有许多不同尺寸的孔穴或立体网状物质凝胶。对不同大小的分子,可分别渗入到凝胶孔内的不同深度,大分子可以渗入到凝胶的大孔内,但进不了小孔,甚至于完全被排斥。小分子,大孔小孔都可以渗进去,甚至进入很深,一时不易洗脱出来。因此,大分子在色谱柱中保留时间较短,小分子在色谱柱中保留时间较长,通过此方法可测定供试品中 $F(ab')_2$ 、IgG 单体和聚体的相对含量。

2 材料和设备

2.1 高效液相色谱仪 (紫外检测器 UV-280nm)。

2.2 色谱柱 亲水硅胶高效体积排阻色谱柱 (SEC 排阻极限 500kD, 粒度 $\leq 5\mu\text{m}$)。

2.3 针头滤器 $0.45\mu\text{m}$ 。

2.4 对照品 市售人免疫球蛋白、人血白蛋白。

2.5 流动相 含 1% 异丙醇的 pH7.0, 0.2mol/L 磷酸盐缓冲液 (量取 0.5mol/L 磷酸二氢钠 200ml、0.5mol/L 磷酸氢二钠 420ml、异丙醇 15.5ml 及水 914.5ml, 混匀)。

3 操作方法

3.1 供试品制备 用流动相将供试品稀释至蛋白浓度为 12mg/ml, $0.45\mu\text{m}$ 滤膜过滤后备用。

3.2 试验条件

3.2.1 流速: 0.6ml/min。

3.2.2 上样量: 供试品及对照品均为 20 μl 。

3.2.3 柱温: 室温。

3.2.4 紫外检测波长: 280nm。

3.2.5 记录时间: 40 分钟。

4 系统适用性

人免疫球蛋白单体峰与裂解体峰的分度应大于 1.5, 人血白蛋白单体峰与二聚体峰的分度应大于 1.5, 拖尾因子按人血白蛋白单体峰计算应为 0.95~1.40。

5 计算

按面积归一法计算色谱图中 $F(ab')_2$ 、IgG 单体和聚体的相对含量。图谱各峰的界限为两峰间最低点到基线的垂直线。主峰为 $F(ab')_2$, 相对保留时间约 0.93 的峰为 IgG 单体, 相对保留时间约 0.86 及之前的峰均为聚体。

6 注意事项

6.1 所有流经色谱柱的液体和样品均需 $0.45\mu\text{m}$ 滤膜过滤, 所有用到的化学试剂均应达到色谱级。

6.2 HPLC 系统的维护应按照相关要求。

6.3 所有数据分析和处理过程应符合 GMP 规范中关于数据完整性的相关要求。

起草人: 张华捷

复核人: 马霄

破伤风抗毒素效价测定法

不同品种抗血清的抗体效价测定方法有所不同, 下面按品种分别介绍。

1 原理

采用小鼠中和试验法, 将系列稀释的供试品与已知浓度的标准品与相同剂量的破伤风毒素结合后分别注射小鼠, 标准品组动物会在 72~120 小时内全部死亡, 与标准品组动物死亡情况相同或最接近的供试品组, 可认为其浓度与标准品相同, 再乘以稀释倍数, 从而推算供试品的初始抗破伤风抗体效价水平。

2 材料和设备

2.1 仪器与设备: 37°C 温箱。

2.2 试剂

2.2.1 稀释液: 称取氯化钠 8.5g、硼酸 4.5g、四硼酸钠 ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) 0.5g, 用水溶解并稀释至 1000ml, 过滤, 灭菌后 pH 值应为 7.0~7.2。

2.2.2 破伤风抗毒素国家标准品: 批号 0041, 900IU/支, 用 66%甘油生理盐水复溶, 100ml 量瓶定容, 储存液浓度 9 IU/ml, 复溶液保存于 $2\sim 8^\circ\text{C}$, 保存时间一般不超过半年。

2.2.3 破伤风毒素: 试验前应使用破伤风抗毒素国家标准品标定其试验量 ($1/10\text{L}^+$), 储存于 50%甘油生理盐水 (生理盐水与灭菌中性甘油等量混合), 每 1ml 至少含 20 个试验量。毒素应保存于 $2\sim 8^\circ\text{C}$ 避光处。

2.2.4 试验动物: 选用体重 17~19g 健康小鼠。

3 操作方法

3.1 标准抗毒素的稀释 将标准抗毒素稀释至每 1ml 含 0.5IU，即与毒素等量混合后每 0.4ml 注射量中含 1/10IU。标准抗毒素原倍溶液的 1 次吸取量应不低于 0.5ml。

3.2 破伤风毒素的稀释 将毒素稀释至每 1ml 含 5 个试验量 (1/10L⁺)，即与抗毒素等量混合后每 0.4ml 注射量中含 1 个试验量 (1/10L⁺)。

3.3 供试品的稀释 将供试品稀释成数个稀释度，使每 1ml 含 0.5IU，即与毒素等量混合后每 0.4ml 注射量中含抗毒素约 1/10IU。稀释度的间隔约为 5%。

3.4 混合 定量吸取已稀释的标准抗毒素及不同稀释度的供试品，分别装入小试管中，每管加入等量之稀释试验毒素，混合均匀，加塞，37℃ 结合 1 小时后，立即注射。

3.5 注射 于小鼠腹部或大腿根部皮下注射 0.4ml，应注意勿使注射液流出，标准品及供试品之每个稀释度各注射小鼠至少 3 只。标准品与供试品不得用同一支注射器注射。同一供试品可用同一支注射器注射。由高稀释度向低稀释度依次注射。在更换稀释度时应用下一稀释度液洗 2~3 次，洗液废弃。

4 结果判定

4.1 应每日上、下午各观察 1 次，连续 5 日，并记录发病及死亡情况。对照小鼠应于 72~120 小时之内全部死亡。供试品的效价为与对照小鼠同时死亡或出现破伤风神经毒症状最重者的最高稀释度。

4.2 有下列情况之一者应予重试：①供试品之稀释度过高或过低；②对照试验小鼠在 72 小时前或 120 小时后死亡；③死亡不规则以及在同一稀释度的小鼠中有 2 只以上属非特异死亡。

4.3 供试品效价 = 与对照反应强度相同的最高稀释倍数 × 稀释后标准品效价。

起草人：张华捷

复核人：马霄

抗蛇毒血清效价测定法

1 原理

采用小鼠中和试验法，将系列稀释的供试品与已知浓度的标准品与相同剂量的蛇毒结合后分别注射小鼠，标准品组动物会在 48~72 小时内全部死亡，与标准品组动物死亡情况相同或最接近的供试品组，可认为其浓度与标准品相同，再乘以稀释倍数，从而推算供试品的初始抗蛇毒抗体效价水平。

2 材料和设备

2.1 仪器与设备：37℃ 温箱。

2.2 试剂

2.2.1 稀释液(硼酸盐缓冲液)：称取氯化钠 8.5g、硼酸 4.5g、四硼酸钠 ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) 0.5g，加入蒸馏水溶解至 1000ml，过滤，置于玻璃瓶中，灭菌后 pH 值为 7.0~7.2。

2.2.2 抗蛇毒血清标准品：由国家药品检定机构提供，用 66% 甘油生理盐水复溶，10ml

量瓶定容,储存液浓度抗银环蛇毒血清 50U/ml、抗蝮蛇毒血清 25U/ml、抗五步蛇毒血清 10U/ml、抗眼镜蛇毒血清 10IU/ml,复溶液保存于 2~8℃,保存时间一般不超过半年。

2.2.3 蛇毒: 试验用的蛇毒须以国家药品检定机构分发的抗蛇毒血清标准品准确标定其试验量(蝮蛇、眼镜蛇及银环蛇 1 个 L⁺, 五步蛇 2 个 L⁺)。使用干燥毒素时,须精密称定,每次称取量应不低于 5mg,溶解后应在 3 天内(保存于 2~8℃)用完。干燥毒素应封存于装有干燥剂的真空器皿中。亦可将冻干蛇毒制成液体蛇毒,即将蛇毒复溶后与中性甘油(经 116℃、10 分钟灭菌)等量混合。每 1ml 至少含 50 个试验量,保存于 2~8℃避光处。

2.3 试验动物 选用体重 18~20g 健康小鼠。

3 操作方法

3.1 标准抗蛇毒血清的稀释 将标准抗蛇毒血清稀释至每 1ml 含 5U(抗银环蛇、抗蝮蛇毒血清)、5IU(抗眼镜蛇毒血清)或 10U(抗五步蛇毒血清),即与 5 个相应蛇毒试验量混合后每 0.4ml 注射量分别含相应抗蛇毒血清效价 1U 或 2U。

3.2 蛇毒溶液的制备 将相应蛇毒稀释至其 5 个试验量不高于 0.8ml,即在与抗蛇毒血清混合后,补加稀释液至 2ml 时,即每 0.4ml 注射量中含 1 个试验量。

3.3 供试品的稀释 将供试品稀释成数个稀释度,使每 1ml 含抗蝮蛇、抗眼镜蛇或抗银环蛇毒血清效价约 5U;抗五步蛇毒血清约 10U。各稀释度间隔 5%~10%。

3.4 混合 定量吸取不同稀释度之供试品各 1.0ml,分别装入小试管中,另外,分别吸取标准抗蛇毒血清稀释液 1.0ml 和 1.2ml,分别装入小试管中,作为对照①和对照②。每管加入 5 个试验量与供试品相应的稀释蛇毒液,补加稀释液至 2ml(即供试品每 0.4ml 注射量中含 1 个试验量或 2 个试验量),混合均匀,加塞,置 37℃ 结合 45 分钟后立即注射小鼠。

3.5 注射 每个稀释度的待检抗蛇毒血清、对照①及对照②各注射小鼠 4 只,每只腹腔注射 0.4ml。应注意勿使注射液流出。

4 结果判定

4.1 试验小鼠每日观察 1 次,观察 48~72 小时,并记录发病及死亡情况。

4.2 对照①小鼠死亡 50%以上,对照②小鼠应比对照①死亡晚、死亡只数少或不死亡。待检抗蛇毒血清之效价应以与对照①小鼠死亡情况(时间、数量)相同之最高稀释度判定。

4.3 供试品的效价=待检品出现与标准反应强度相同的最高稀释倍数×稀释后标准品每 1ml 中含的单位数。

起草人: 张华捷

复核人: 马霄

毒抗毒素效价测定法

1 原理

采用小鼠中和试验法,将系列稀释的供试品与标准品与相同剂量的肉毒毒素结合后分别注射小鼠,观察 4 天,通过比较供试品与标准品组动物的 50%死亡(存活)情况,推算供试品的初始抗破伤风抗体效价水平。

2 材料与设备

2.1 仪器与设备：37℃温箱。

2.2 试剂

2.2.1 稀释液：称取磷酸二氢钾 0.7g、磷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 2.4g、氯化钠 6.8g，用注射用水溶解并稀释至 1000ml，加明胶 2.0g，溶解后过滤。灭菌后 pH 值应为 6.2~6.8。

2.2.2 肉毒抗毒素标准品：由国家药品检定机构提供。

2.2.3 肉毒毒素：试验用毒素须以国家药品检定机构分发的肉毒抗毒素标准品准确标定其试验量（见测定参数表），并每 3 个月复检 1 次。使用干燥毒素时，须以精确的分析天平称取，每次称量应不低于 10mg，溶解后应 1 次用完。余存之干燥毒素应封存于装有干燥剂之真空器皿中。亦可用干燥毒素制成液体甘油毒素，即干燥毒素以生理氯化钠溶液溶解与中性甘油（经 116℃、10 分钟高压蒸汽灭菌）等量混合，每 1ml 至少含 20 个试验量。毒素应保存于 2~8℃ 避光处。

肉毒抗毒素效价测定参数表

抗毒素 种类	毒素 试验量	稀 释		混 合			注 射			动物 只	途径
		抗毒素 $\text{IU} \cdot \text{ml}^{-1}$	毒素试 验量/ml	抗毒素 ml	毒素 ml	稀释液 /ml	剂量 ml	抗毒素 IU	毒素试 验量		
A	1/5L ⁺	1.0	5	1.0	1.0	0.5	0.5	1/5	1	4	腹腔
B	1/10L ⁺	0.5	5	1.0	1.0	0.5	0.5	1/10	1	4	腹腔
C	L ⁺	5.0	5	1.0	1.0	0.5	0.5	1	1	4	腹腔
D	L ⁺	5.0	5	1.0	1.0	0.5	0.5	1	1	4	腹腔
E	1/50L ⁺	0.1	5	1.0	1.0	0.5	0.5	1/50	1	4	腹腔
F	1/20L ⁺	0.25	5	1.0	1.0	0.5	0.5	1/20	1	4	腹腔

2.3 试验动物 选用体重 14~16g 健康小鼠。

3 操作方法

3.1 标准抗毒素的稀释 将肉毒抗毒素标准品稀释至每 1ml 所含效价如测定参数表所示。肉毒抗毒素标准品原倍溶液的 1 次吸取量应不低于 0.5ml。

3.2 毒素的稀释 将毒素稀释至每 1ml 含 5 个毒素试验量，如测定参数表所示。

3.3 供试品的稀释 将供试品稀释成数个稀释度，使每 1ml 约含测定参数表所示单位。稀释度之间隔约为 5%~10%。

3.4 混合

3.4.1 标准抗毒素对照组：精密量取已稀释之肉毒抗毒素标准品 0.8、1.0、1.2ml 分别装入小试管中，再依次分别补加稀释液 0.7、0.5、0.3ml（可在抗毒素之前加入）。

3.4.2 供试品试验组：吸取不同稀释度之供试品各 1.0ml 分别装入小试管中，每管补加稀释液 0.5ml（可在抗毒素之前加入）。

3.4.3 以上各管分别加入稀释毒素 1.0ml, 混合均匀, 加塞, 37℃结合 45 分钟, 立即注射。

3.5 注射 按测定参数表所示剂量与途径, 每稀释度液注射小鼠 4 只。

4 结果判定

4.1 每天上、下午各观察试验动物 1 次, 并记录发病及死亡情况, 连续 4 天。

4.2 以标准品组动物 50%死亡终点比较供试品组动物的 50%保护终点, 推算供试品的效价。

4.3 有下列情况之一者予以重试

4.3.1 标准品组动物无死亡或全死亡, 或死亡极不规律而无法计算 50%死亡终点。

4.3.2 供试品组动物无死亡或全死亡, 或死亡极不规律而无法计算 50%保护终点。

4.3.3 每稀释度注射的动物中有 2 只以上属非特异死亡。

4.4 待检抗毒素的效价 = 待检品出现与标准品反应强度相同的最高稀释倍数 × 稀释后标准品每 1ml 中含的单位数 (IU)

起草人: 张华捷

复核人: 马霄

白喉抗毒素效价测定法

1 原理

采用家兔皮肤试验法, 将系列稀释的供试品与已知浓度的标准品与相同剂量的白喉毒素结合后分别注射家兔皮肤, 观察 48~72 小时, 在注射部位皮肤会出现红斑, 红斑大小与毒素剂量呈正相关, 通过比较供试品与标准品组动物的红斑直径大小, 从而推算供试品的初始抗白喉抗体效价水平。

2 材料和设备

2.1 仪器与设备: 37℃温箱。

2.2 试剂

2.2.1 稀释液: 称取氯化钠 8.5g、硼酸 4.5g、四硼酸钠 ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) 0.5g, 用水溶解并稀释至 1000ml, 过滤, 灭菌后 pH 值应为 7.0~7.2。

2.2.2 白喉抗毒素国家标准品: 由国家药品检定机构提供。

2.2.3 白喉试验毒素: 由国家药品检定机构提供, 亦可自备, 但应选经保存 1 年以上、毒力适宜的毒素。试验用的毒素须以国家药品检定机构分发的标准抗毒素准确标定其试验量 (1/300Lr), 并应每 3 个月复检 1 次。毒素应保存于 2~8℃避光处, 并加入甲苯或其他适宜防腐剂。

2.3 试验动物 用体重 2~3kg 的健康白皮肤家兔, 试验前 1 日用适宜方法进行背部脱毛或试验当日采用剃毛设备剃除背部毛发, 凡皮肤发炎或出现大量斑点现象者不应使用。

3 操作方法

3.1 抗毒素标准品的稀释 将标准抗毒素稀释至每 1ml 含 1/15IU, 即与毒素等量混合后每

0.1ml 注射量中含 1/300IU。标准抗毒素原液的一次吸取量应不低于 0.5ml。

3.2 白喉毒素的稀释 将毒素稀释至每 1ml 含 20 个试验量 (1/300Lr)，即与抗毒素等量混合后每 0.1ml 注射量中含 1 个试验量 (1/300Lr)。

3.3 供试品的稀释 用稀释液将供试品稀释成数个稀释度，使每 1ml 含抗毒素约 1/15IU。稀释度间隔约为 5%~10%。

3.4 混合 定量吸取已稀释的抗毒素及不同稀释度的供试品，分别装入小试管中，每管加入等量之稀释试验毒素，混合均匀，加塞，37℃ 结合 1 小时后，立即注射。

3.5 注射 每份样品注射 2 只家兔，每只家兔不能超过 4 份样品。每稀释度注射 0.1ml 于家兔皮内（应在近背脊两侧）。每只家兔至少应包括 3 个不同注射部位（前、中、后）的对照试验。标准品溶液与供试品溶液不得用同一支注射器注射。同一供试品可用同一支注射器注射。由高稀释度向低稀释度依次注射。在更换稀释度时应用下一稀释度液洗 2~3 次，洗液废弃。

4 结果判定

4.1 试验家兔于注射后 48 及 72 小时各观察 1 次，并测量反应面积。以 48~72 小时结果作最后判定。注射对照部位一般于 48~72 小时内轻度发红，其直径应为 10~14mm。待检抗毒素之效价应以与多数对照的反应强度相同的最高稀释度判定之，但反应强度不得超过对照。

4.2 有下列情况之一者应予重试：

4.2.1 对照反应不合规定标准。

4.2.2 供试品的稀释度过高或过低。

4.2.3 反应不规则。

4.3 效价 = 供试品出现与标准品反应强度相同的最高稀释倍数 × 稀释后标准品每 1ml 中含的单位数。

起草人：张华捷

复核人：马霄

气性坏疽抗毒素效价测定法

1 原理

采用小鼠中和试验法，将系列稀释的供试品和标准品与相同剂量的气性坏疽毒素结合后分别注射小鼠，通过比较供试品与标准品组动物的死亡情况，从而推算供试品的初始抗气性坏疽抗体效价水平。

2 材料和设备

2.1 仪器与设备 37℃ 温箱。

2.2 试剂

2.2.1 稀释液：称取氯化钠 8.5g、硼酸 4.5g、四硼酸钠 ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) 0.5g，用水溶解并稀释至 1000ml，过滤，灭菌后 pH 值应为 7.0~7.2。

2.2.2 气性坏疽（产气荚膜、水肿、败毒、溶组织）抗毒素国家标准品：由国家药品检定

机构提供。

2.2.3 气性坏疽毒素：试验用的毒素须以国家药品检定机构分发的标准抗毒素准确标定其试验量（见测定参数表），并每3个月复检1次。使用干燥毒素时，须以精确的分析天平称取，每次称取量应不低于10mg，溶解后应1次用完。余存之干燥毒素应封存于装有干燥剂之真空器皿中。亦可用干燥毒素制成液体甘油毒素，即干燥毒素以生理氯化钠溶液溶解与中性甘油（经116℃、10分钟高压蒸汽灭菌）等量混合，每1ml至少含50个试验量。毒素应保存于2~8℃避光处。

2.3 实验动物 选用体重17~19g健康小鼠。

3 操作方法

3.1 抗毒素标准品的稀释 将抗毒素标准品稀释至每1ml含测定参数表所示效价。抗毒素标准品原液的1次吸取量应不低于0.5ml。

3.2 试验毒素的稀释 将试验用的毒素稀释至每1ml含5个毒素试验量（水肿型为20个），如测定参数表所示。

气性坏疽抗毒素效价测定参数表

抗毒素 种类	毒素 试验量	稀 释		混 合			注 射				
		抗毒素/ IU·ml ⁻¹	毒素试验 量/ml	抗毒素 ml	毒素/ ml	稀释 液/ml	剂量/ ml	抗毒素 /IU	毒素试 验量	动物 只	途径
产气荚膜 败毒	1/5L ⁺ L ⁺	1.0 5.0	5 5	1.0 1.0	1.0 1.0	0.5 0.5	0.5 0.5	1/5 1	1 1	4 4	静脉 静脉
溶组织	1/2L ⁺	2.5	5	1.0	1.0	0.5	0.5	1/2	1	4	静脉
水肿	1/50L ⁺	0.2	20	1.0	0.5	0.5	0.2	1/50	1	4	肌内

3.3 供试品的稀释 将供试品稀释成数个稀释度，使每1ml约含5个试验量（水肿型为20个）。稀释度之间间隔约为5%~10%。

3.4 混合

3.4.1 抗毒素标准品对照组：吸取已稀释的抗毒素标准品0.8、1.0、1.2ml分别装入小试管中，再依次分别补加稀释液0.7、0.5、0.3ml。

3.4.2 供试品试验组：吸取不同稀释度的供试品各1.0ml分别装入小试管中，每管补加稀释液0.5ml（可在抗毒素之前加入）。

以上各管分别加入稀释毒素1.0ml（水肿型为0.5ml），混合均匀，加塞，20~25℃结合1个小时，立即注射。

3.5 注射 按测定参数表所示剂量与途径，每稀释度注射小鼠4只。标准品与供试品不得用同一支注射器注射。同一供试品可用同一支注射器注射。由高稀释度向低稀释度依次注射。在更换稀释度时应用下一稀释度液洗2~3次，洗液废弃。

4 结果判定

4.1 每天上、下午各观察试验动物1次，并记录发病及死亡情况，连续3天。

4.2 标准品组动物在3天之内，注射抗毒素量最少（即0.8ml）的4只动物中至少应有2

只以上死亡。

对比标准品组与供试品组动物死亡情况，推算待检抗毒素的效价。

4.3 有下列情况之一者应予重试：

4.3.1 标准品组动物在 3 天之内全部死亡或者全无死亡，或者注射抗毒素量最少的 4 只动物死亡不足半数，注射抗毒素量最多的 4 只动物死亡超过半数。

4.3.2 试验组动物在 3 天内全部死亡或者全无死亡。

4.3.3 动物死亡数极不规则，以致无法进行判定。

4.3.4 每稀释度注射的动物中有 2 只以上属非特异死亡。

4.4 供试品的效价 = 供试品出现与标准品反应强度相同的最高稀释倍数 × 稀释后标准品每 1ml 中含的单位数。

起草人：张华捷

复核人：马霄

变应原制品

简 述

变应原制品是一类从能够引起和（或）激发过敏反应的天然原材料中提取出来的含致敏活性蛋白的混合物制备而成的制品，是用于 IgE 介导的变态反应性疾病体内诊断和特异性免疫治疗的生物制剂。变应原免疫治疗是一种脱敏治疗方法，即给已致敏的机体反复注射含有适宜变应原的药物制剂，耗竭其体内效应物质和（或）刺激封闭性抗体（如 IgG）产生，从而使致敏机体对特定变应原产生耐受，减缓过敏症状。变应原制品的种类繁多，来源于各种可导致过敏症的天然原材料，如植物及其花粉、霉菌、螨虫、蟑螂、动物上皮和（或）皮肤衍生物（例如猫毛皮屑、狗毛、马毛皮屑）、昆虫毒液（例如蜂毒）以及各种食物。变应原制品多数是天然粗抗原提取物，以螨虫提取物为例，目前已鉴定出 34 种具有致敏活性的蛋白组分，因而质量控制难度较大。各国的监管机构及各企业一直都致力于变应原制品的质量控制，但其标准化程度依赖于各国调控政策，至今尚未实现国际标准化。

变应原制品主要分为体内诊断试剂和变应原特异性治疗制品，前者主要包括为皮肤点刺试剂和皮内诊断试剂；后者主要包括皮下注射用制剂、舌下滴剂、舌下片剂。

变应原制品复杂属性使得其质量控制也是该研究领域面临的很大挑战。螨变应原制品是目前我国唯一获批上市销售的变应原制品，是一类用于螨虫引起的变态反应性疾病体内诊断和脱敏治疗制品总称。由于原材料为螨虫培养物，因此螨变应原制品的质量控制与其他生物制品一样，涉及整个生产过程，应根据从研发到规模化生产的相关研究结果，确定和完善生产工艺关

键步骤及相应的质量控制要求,以确保生产工艺的稳定性以及产品质量的一致性。

变应原制品检定应依据现行版《中国药典》或其他国家药品标准进行测定,并应符合相关要求。检定内容按照生产阶段分为原液、半成品、成品。其中原液检定主要包括鉴别、总蛋白含量测定、外观、pH值、主要变应原含量、总变应原活性等;半成品检定主要包括无菌检查,铝佐剂吸附的制剂应进行吸附效率测定;成品检定主要包括鉴别(蛋白图谱鉴别和变应原图谱鉴别)、外观、装量、pH值、总蛋白含量、主要变应原含量、总变应原活性、无菌检查等。依据生产工艺的不同,对于一些其他辅料例如氯化钠、苯酚、硫柳汞、氢氧化铝佐剂、甘油、组胺等也需要进行检测,并规定其添加范围的质量标准。对于铝佐剂吸附的制品,不仅需要测定铝佐剂含量,同时必须能够保证吸附效果和吸附后的稳定性,可通过测定上清中的可溶性蛋白浓度或游离变应原活性进行检定。皮下注射液和皮肤点刺试剂须进行无菌检查,确保无菌生长;舌下滴剂及片剂须进行微生物限度检查。

鉴别试验

1 原理

通过蛋白质分子量大小及其所带电荷的不同使其在 SDS-PAGE 凝胶中分离,再将 SDS-PAGE 凝胶中的蛋白质转移到固相支持物 PVDF 膜上,依据特异性抗体对待测蛋白的结合而达到检测的目的。

2 材料和试剂

- 2.1 水(电阻率不低于 $18.2\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$)。
- 2.2 解吸附液: 0.5mol/L EDTA-Na (pH 8.0), 或 0.4mol/L PBS 缓冲液体。
- 2.3 0.01mol/L 磷酸盐缓冲液, 或同等试剂。
- 2.4 Nupage[®] LDS Sample buffer (4×), 或同等试剂。
- 2.5 Nupage[®] MOPS SDS Running buffer (20×), 或同等试剂。
- 2.6 蛋白分子量标准, 如 SeeBlue[®] Plus2 Pre-Stained Standard。
- 2.7 染色液, SimplyBlue TM SafeStain, 或自配制考马斯亮蓝 G250/G250 染色液, 或银染试剂盒
- 2.8 显色液, 如 1-Step TM NBT/BCIP Substrate Solution, 或荧光染色液。
- 2.9 其他材料 离心管、移液管、4%~12% Blot Bis-Tris Plus gel 或其他同等商品(也可自制备 SDS-PAGE 蛋白电泳凝胶)、PVDF 膜或 iBlot 2 PVDF Regular Stacks、iBind Flex Card 及相关试剂。
- 2.10 设备 iBind 免疫印迹装置、离心机、摇床、电泳仪、转膜装置等。

3 操作方法

3.1 蛋白电泳图谱鉴别

3.1.1 供试品处理

3.1.1.1 吸附类变应原制品的解吸附: 取供试品 1.5ml 于 1.5ml 灭菌离心管中, 8000g 离心 5 分钟, 去上清, 1ml 解吸附液溶解底部乳白色絮状沉淀, 封口膜封口, 常温下置于摇床(每分钟 100 转)过夜。

取过夜反应溶液,8000g 离心 5 分钟,上清转移至一新的 1.5ml 灭菌离心管中。并利用 Amicon Ultra-0.5 离心过滤装置进行超滤浓缩至约 100 μ l, 后用 0.01mol/L 磷酸盐缓冲液进行脱盐置换处理 4 次, 每次 500 μ l, 并最终离心至约 50 μ l, 随即进行后续实验。

3.1.1.2 含甘油类变应原制品的处理 取适量供试品与等体积的 4g/L 的碳酸氢铵缓冲液, 或 0.01mol/L 磷酸盐缓冲液充分混匀, 加入超过滤器®Ultra-15 中进行离心过滤, 浓缩供试品并去除甘油。室温条件下, 4000g, 离心 1 小时。弃掉滤液, 保留过滤柱中上清(100~200 μ l), 再加入适宜体积缓冲液, 室温条件下, 4000g, 离心 30 分钟。反复操作 2~3 次, 最终离心至过滤柱中残留液体体积 50~200 μ l 时, 回收过滤柱中残留液体, 进行后续试验。

3.1.2 SDS-PAGE

3.1.2.1 对照品的制备: 取 1mg/ml 的对照品 25 μ l, 加入 10 μ l 4 \times LDS Sample buffer, 5 μ l 去离子水, 在 70 $^{\circ}$ C 金属浴下加热 10 分钟。

3.1.2.2 供试品溶液的制备: 取 3.1.1 中处理后的供试品 25 μ l, 加入 10 μ l 4 \times LDS Sample buffer, 5 μ l 去离子水, 在 70 $^{\circ}$ C 金属浴下加热 10 分钟。

3.1.2.3 配制电泳缓冲液, 安装预制凝胶, 电泳内池加入 600ml 电泳液, 外池加 200ml 电泳液。

3.1.2.4 上样: 吸取适量蛋白分子量标准品 Marker, 20~40 μ l 对照品溶液, 20~40 μ l 供试品溶液, 加样于凝胶的样品孔中。

3.1.2.5 电泳: 120V, 电泳 1 小时。

3.1.2.6 染色: 电泳后的凝胶浸入染色液中, 1 小时后取出, 浸入脱色液中脱色至几无底色, 取出凝胶置于水中观察。也可以采用银染试剂盒进行银染。

3.2 免疫印迹

3.2.1 供试品处理及电泳, 参见 3.1。

3.2.2 转膜 取 SDS-PAGE 电泳后的凝胶, 切去胶下端的蓝色条, 可分别采用湿式转印或干式转印方法进行转膜。

3.2.2.1 湿式转印 在转膜缓冲液中浸润海绵、滤纸和 PVDF 膜, 将浸润的海绵放入转膜仪的阴极, 其上依次放上浸过的滤纸、SDS-PAGE 凝胶、PVDF 膜、滤纸、两块海绵, 各层之间避免有气泡存在; 将阳极片放在海绵上, 将整个转膜盒放入电泳池中, 固定好; 加入转膜液, 在 30V 电压下转膜 1 小时。

3.2.2.2 干式转印 打开 iBlot 2 转膜试剂盒, 将白色分隔层上侧凝胶放置一旁, 揭去 PVDF 膜上的盖膜, 保持底部层仍在塑料托盘内; 将托盘置于 iBlot 2 转印仪内; 将蛋白凝胶置于底层盒的 PVDF 膜上, 然后把 iBlot 2 滤纸在去离子水中浸湿后覆盖在凝胶上, 用滚轴赶除气泡, 再将转膜试剂盒顶部层重新覆盖在预浸滤纸上, 用滚轴除去气泡; 将海绵置于顶部, 使电触点与 iBolt 2 转印上电触点对齐, 盖上盖, 选择适宜的转印程序并点击运行, 转印时间一般为 5~10 分钟。

3.2.3 免疫印迹

3.2.3.1 用小镊子将转印好的 PVDF 膜放入装有 50ml 封闭液的盒子中, 室温下封闭 1 小时。

3.2.3.2 用洗液漂洗 3 次, 每次 10 分钟。

3.2.3.4 用洗液稀释一抗或抗组 1/组 2 过敏原单抗至 20ml, 4 $^{\circ}$ C 下一抗孵育膜过夜。

3.2.3.5 第二天用洗液漂洗 3 次, 每次 10 分钟。

3.2.3.6 用洗液稀释二抗(偶联碱性磷酸酶抗人 IgE 单抗或兔抗鼠 IgG 单抗)至 20ml, 37 $^{\circ}$ C

二抗孵育膜 2 小时。

3.2.3.7 用洗液漂洗 3 次，每次 10 分钟。

3.2.3.8 用 BCIP 染色液对膜进行染色 10~15 分钟，也可采用荧光染色液进行显色反应。

3.2.3.9 用蒸馏水洗涤 2 次，每次 5 分钟。

3.2.3.10 将膜放在滤纸上风干，观察反应条带。

3 结果与判定

3.1 SDS-PAGE SDS-PAGE 应获得与参考对照提取物相类似的电泳图谱，主要变应原的分子量符合标准规定。

3.2 免疫印迹 应检测到与质量标准规定分子量大小一致的特异性变应原反应条带。

4 注意事项

4.1 SDS-PAGE 电泳时若条带不整齐可适当调低电压。

4.2 转膜时电压不宜过高，时间不宜过久，否则会导致转膜失败。

4.3 免疫印迹时应使 PVDF 膜和一抗、二抗的作用充分。

起草人：张影

复核人：王斌

主要变应原含量测定法

1 原理

变应原可与特异性单克隆抗体结合，并且有含量-反应关系。利用 ELISA 方法检测其含量-反应关系，根据变应原标准品含量，可以定量的检测出样品变应原的含量。

2 材料和设备

2.1 设备 酶标仪（含 SOFTMAX.PRO 软件），96 孔自动洗板机，电子天平。

2.2 试剂 结合单克隆抗体、检测单克隆抗体、标准品、对照品、PBS 缓冲液（0.01mol/L pH7.4 的磷酸盐/磷酸氢盐缓冲液或同等商品化产品）、包被液（0.05mol/L 的 pH9.6 碳酸/碳酸氢盐缓冲溶液或 PBS 缓冲液）、洗涤液（PBS-0.1%吐温 20 或 PBS-0.05%吐温 20）、封闭液（PBS-1%BSA 或 PBS-1%BSA-0.05%吐温 20）、终止液、显色液。

2.3 其他材料 NUNC-Maxisorp 平底酶标板或同等产品、Vortex 搅拌器、透明黏性保护膜、铝箔和吸水纸、多道加样器、微量加样器及多通道加样器。

3 操作方法

3.1 包被 将检测用单克隆抗体包被液稀释至适宜浓度。用多通道移液器加入酶标板，100 μ l/孔。盖上板盖，2~8 $^{\circ}$ C 孵育过夜。

3.2 洗板 洗板 3~5 次（300 μ l/孔）。

3.3 封闭 加入适宜封闭缓冲液，300 μ l/孔。盖上保护膜，密闭包装，室温条件下孵育 1~2 小时，或者 2~8 $^{\circ}$ C 条件下孵育过夜。

3.4 样品制备

3.4.1 标准品溶液的准备 将浓度已知的标准品用洗涤液或封闭液进行复溶, 然后进行 1/2 或 1/3 系列倍比稀释, 得到线性范围内的 5~7 个稀释浓度。

3.4.2 对照品溶液的准备: 将浓度已知的对照品用稀释缓冲液进行稀释, 得到第一组或第二组过敏原含量位于线性检测范围内的 2 个的浓度。

3.4.3 供试品的准备 供试品用稀释缓冲液稀释至实际可测的范围为待测样品, 至少要 2 种不同的稀释度。含甘油的供试品稀释后要保证甘油浓度要 $< 1\%$ (对于含 50% 甘油的供试品, 如针刺诊断试剂, 稀释度大于 1:50 时才能检测)。首次稀释可采用正位移液器操作。稀释缓冲液作为空白对照。

3.5 洗板 洗板 3~5 次 (300 μ l/孔)

3.6 加样 每孔内加入各稀释度的标准品、各个待测样品和内部对照品 100 μ l, 均加复孔。空白加入 100 μ l 稀释缓冲液, 也加复孔。盖上盖子, 室温孵育大约 1~2 小时 (抗体/过敏原反应: 待检测的过敏原被捕获单克隆抗体所固定)。

3.7 洗板 洗板 3~5 次 (300 μ l/孔)。

3.8 加入检测单克隆抗体 每孔加入适当稀释的抗尘螨 1 组抗原的特异性抗体或抗尘螨 2 组抗原的特异性抗体各 100 μ l/孔 (稀释浓度参考厂家提供资料)。盖上盖, 在室温下孵育 1~2 小时 (抗体/过敏原反应: 检测单克隆抗体结合到过敏原-捕获单克隆抗体复合物上)。

3.9 洗板 洗板 3~5 次 (300 μ l/孔)。

3.10 孵育酶复合物 每孔加入 100 μ l 合理稀释的过氧化物酶复合物 (或者过氧化物酶偶联生物素酶复合物), 盖上盖, 在室温下孵育 1~2 小时 (酶复合物的结合: 过氧化物酶直接或者通过生物素结合到检测抗体上)。

3.11 洗板 5 次 (300 μ l/孔) 过量的未结合的酶复合物通过清洗加以去除。

3.12 每孔加入 100 μ l 底物显色液, 用铝箔盖上板子, 室温下避光 10~30 分钟。

3.13 每孔加入 50~100 μ l 终止液 (3mol/L HCl 或 4mol/L H₂SO₄)。

3.14 在适宜波长处读取光吸收值。

4 计算

4.1 人工计算 根据标准品范围的光吸收, 做出一个函数曲线 $\log(\text{浓度}) = f[\log(\text{光吸收})]$ 。样品浓度从这个曲线上计算出来。

4.2 自动计算 在 SOFTMAX.PRO 软件中选择合适曲线 (四参数拟合) 对标准进行自动计算, 根据标准曲线, 自动计算稀释后待测样品的过敏原含量, 再乘以稀释倍数, 直接得出供试品的含量结果。

5 结果与判定

符合如下结果, 测定有效: 空白 OD 值小于 0.2; 曲线上点 OD 值最大值要大于 1; 曲线上点要与所绘制曲线吻合, 至少 3 个点大约位于线性部分, 相关系数 $R^2 \geq 0.980$ 。

主要变应原含量应为标识量的 50%~200%。

6 注意事项

6.1 待测物的浓度应在标准曲线的线性部分, 否则可能会造成结果不准确。

6.2 单克隆抗体孵育时应反应充分。

起草人：张影

复核人：王斌

总变应原活性测定（一）—ELISA 竞争抑制法

1 原理

先用变应原（一般为参考品）包被酶标板，然后依次加入参考品、供试品及对照品，再加入抗体血清。后面添加的游离变应原与固定包被在酶标板微孔表面上的变应原竞争结合血清中的 sIgE 抗体（一抗），并有含量-反应关系。此酶标板经洗涤后，再加入酶标记的抗 IgE 抗体（二抗，结合了荧光物质），最终形成变应原-sIgE 抗体-酶的复合物。复合物可使加入的底物（TMB）发生颜色反应，通过检测 OD 值可以推算待测样品的变应原活性。

2 材料和设备

2.1 设备 酶标仪（带 SOFTMAX.PRO 软件）、振荡器、37℃培养箱，洗板机，离心机等

2.2 试剂 变应原参考品、内控品、变应原活性检定用阳性血清和（或）阴性血清、过氧化物酶标记的抗人 IgE 抗体、PBS 缓冲液（0.01mol/L pH7.4 的磷酸盐/磷酸氢盐缓冲液或同等商品化产品）、包被液（0.05mol/L 的 pH9.6 碳酸/碳酸氢盐缓冲溶液或 PBS 缓冲液）、洗涤液（PBS-0.1%吐温 20 或 PBS-0.05%吐温 20）、封闭液（PBS-1%BSA 或 PBS-1%BSA-0.05%吐温 20）、稀释液（封闭液或洗涤液）、终止液、显色液等。

2.3 其他材料 96 孔板（Costar 3370 或同等产品），加样器，多道加样器，Vortex 搅拌器。

3 操作方法

3.1 包被和封闭 用包被液稀释总变应原活性检定用包被抗原，至蛋白浓度约 10~50μg/ml，混匀，100μl/孔加样，2~8℃条件下孵育 16~24 小时。次日洗涤 3~5 次，拍干，加入封闭液（1% BSA-PBST），每孔 300μl，37℃±2℃孵育 1~3 小时。

3.2 样品制备

3.2.1 参考品处理 参考品进行适宜倍数的稀释，得到参考品溶液的第一个稀释点，然后进行 1/2 或者 1/3 倍系列稀释，共得到 5~7 个稀释梯度，稀释范围应包含 50%抑制率处。

3.2.2 供试品溶液的制备：供试品用稀释缓冲液稀释；稀释过程可同参考品处理；或者选择 2 个浓度落在检测范围内的稀释梯度。

3.2.3 内控品处理 内控品用稀释缓冲液稀释，稀释过程可同参考品，若采用定量活性测定方法，可选择 2 个浓度落在标准曲线线性检测范围内的稀释梯度。

3.2.4 阳性血清溶液、阴性血清溶液的制备 用稀释液稀释总变应原活性检定用阳性血清至适宜范围；用稀释液对总变应原活性检定用阴性血清作相同倍数稀释，作为阴性血清溶液。

3.2.5 加样 取稀释好的各浓度参考品、内控品、供试品各 50μl，加入酶标板中，每个稀释度加两孔；每孔再加入 50μl 适当稀释的特异性血清（人过敏原特异性血清用稀释缓冲液进行稀释。最佳的稀释倍数对应于需要与所有包被抗原形成复合体的 IgE 的量。）

阳性对照（0%抑制）：50μl 稀释缓冲液+50μl 特异性血清；2~5 孔。

阴性对照：50 μ l 稀释缓冲液 + 50 μ l PBS-5%HSA 缓冲液（或 100 μ l 稀释液）；2~5 孔。

100%抑制：50 μ l 特异性血清 + 50 μ l 复溶后参考品。

3.2.6 孵育：酶标板贴上封板膜后室温条件下孵育过夜（16~24 小时），或者 2~8 $^{\circ}$ C 孵育过夜。

3.2.7 测定：取出孵育的酶标板，洗板 3~5 次，拍干。将辣根过氧化物酶标记的鼠抗人 IgE 稀释，以每孔 100 μ l 加至酶标板内。37 $^{\circ}$ C \pm 2 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时，洗板 3~5 次，拍干，加入 TMB 显色液每孔 100 μ l，室温显色至阳性血清对照 OD 值大于 0.8，加终止液终止反应，用酶标仪在波长 450nm 处测定 OD 值。

4 计算

4.1 双平行线法测定相对活性 由酶标仪上读到的信号越高，孔溶液中的过敏原浓度越低，吸收值是和参考品的稀释倍数成反比。可绘制出参考品溶液的浓度-抑制曲线，得到以 450nm 的光吸收 OD 值对稀释倍数的对数的函数。参考品的初始浓度是已知的，对每一个 OD 值参考品和样品的稀释比率可以计算出样品浓度。在标准曲线上根据待测样品的 OD 值计算浓度值。要求至少有 2 个浓度值在检测范围内，该浓度值乘以稀释倍数，得到每个供试品的变应原活性。

4.2 定量法测定变应原活性 在 SOFTMAX.PRO 软件中选择合适曲线（四参数拟合）对标准品进行自动计算，并绘制标准曲线。根据标准曲线，自动计算稀释后样品的活性值，再乘以稀释倍数，即为供试品的活性。

5 结果与判定

符合如下结果，测定有效：空白 OD 值小于 0.2；相关系数 $R^2 \geq 0.95$ 。变应原制品的生物活性应为为参考品的 50%~200%。

起草人：张影

复核人：王斌

总变应原活性测定（二）—Unicap 测定法

1 原理

在 ImmunoCAP 检测系统中，商品化的变应原吸附于高亲和力的纤维素材料上（CAP），仪器可将待检测样本加入到 CAP 上，特异性 IgE 与 CAP 上的特定抗原结合，再进一步与酶底物结合，最后通过酶底物上的荧光强度可判定检测样本中的 IgE 浓度，再根据配套的 IgE 定量检测用参考品，可计算出反应体系中的 IgE 值。

2 材料和设备

2.1 设备 Unicap100 全自动过敏原分析仪、离心机。

2.2 试剂 Immuno CAPTM Specific IgE Calibrators（校准品）、Immuno CAPTM Specific IgE Curve controls（曲线质控）、Immuno CAPTM Specific IgE Anti-IgE（定量校正用 CAP）、Immuno CAPTM Specific IgE Conjugate（酶标二抗）、Immuno CAPTM Allergen d1（D. pteronyssinus，屋尘

螨)、Immuno CAP™ Development solution (发展液)、Immuno CAP™ Washing solution (洗液)、Immuno CAP™ Stop solution (终止液)、尘螨阳性血清池、0.1mol/L 磷酸盐缓冲液 (PBS, pH7.4)。

3 操作方法

3.1 尘螨阳性血清池的稀释 用 0.01mol/L 磷酸盐缓冲液 (PBS, pH7.4) 将阳性血清池稀释至适宜范围。

3.2 取适量供试品与血清等体积混合, 充分混匀。

3.3 将混合后的样品置于 2~8℃ 冰箱孵育过夜。

3.4 第二天将样品取出, 再次混匀, 4500g 下离心 3 分钟, 吸取上清液于新的 EP 管中。

3.5 以 PB 代替样品, 作为空白对照, 所有步骤操作同供试品。

3.6 在 Unicap 分析仪上检测变应原特异性 IgE 含量 (kU/L), 每个供试品至少重复测定 2 次。

4 计算

$$\text{抑制率}\% = \frac{\text{空白对照 (kU/L)} - \text{供试品 (kU/L)}}{\text{空白对照 (kU/L)}} \times 100$$

5 结果与判定

供试品抑制率应符合标准规定; 氢氧化铝佐剂吸附制剂上清的抑制率应符合标准规定。

起草人: 张影

复核人: 王斌

组胺含量测定法 (HPLC 法)

1 原理

不同含量的组胺在通过高效液相色谱柱后, 形成与含量相关的吸收峰面积。通过组胺含量和吸收峰的相关关系, 利用组胺含量标准品, 可以测定供试品的组胺含量。

2 材料和设备

2.1 设备 加样器、高效液相色谱仪、高效液相色谱柱、过滤器。

2.2 试剂 超纯水、乙腈、三乙胺、85%磷酸、磷酸组胺·H₂O、1-甲基-组胺·2HCl、3-甲基-组胺·2HCl、甲醇、甘油、磷酸缓冲盐。

2.3 其他材料: 5ml 和 10ml 量瓶。

3 操作方法

3.1 流动相的制备 将 42.12g NaH₂PO₄·2H₂O 溶解在 850ml 超纯水中, 加 5ml 三乙胺, 用 85% 的磷酸调节 pH 至 4.0, 补水至 900ml, 加 100ml 乙腈, 用 0.2μm 过滤器过滤。

3.2 标准品、对照和待测样品的制备

3.2.1 制备标准品 称取 100mg 磷酸组胺, 用 PBS-甘油 (1:1) 定容至 10ml, 得浓度

为 10mg/ml 的标准品储备液。取标准品储备液用流动相分别稀释至 0.010mg/ml、0.025mg/ml 和 0.040mg/ml。

3.2.2 阳性对照品溶液 称取 100mg 1-甲基-组胺·2HCl, 10mg 3-甲基-组胺·2HCl, 用 1ml 纯水溶解, 混匀, 取 125 μ l 用 PBS-甘油 (1:1) 定容至 5ml。

取标准品储备液、甲基-组胺·2HCl 与 3-甲基-组胺·2HCl 混合液用流动相稀释至含 1-甲基-组胺·2HCl 和 3-甲基-组胺·2HCl 各 0.125 μ g/ml, 磷酸组胺 20 μ g/ml。

3.2.3 同时用流行相将供试品稀释 1000 倍。

3.3 分析条件 上样量: 20 μ l; 流速: 1ml/min; 检测波长: 220nm。

3.4 系统适用性检查 取阳性对照品溶液连续进样 5 针, 计算各响应值的拖尾因子和重复性。其中拖尾因子应在 0.95~1.05 之间, 5 次测定值重复性的相对标准偏差应不大于 2.0%。

4 结果计算

以标准品的组胺浓度与其产生的特征性吸收峰面积为坐标, 制作标准曲线, 根据标准曲线计算加入检测体系的样品的组胺含量, 乘以稀释倍数, 即为供试品的组胺含量。

起草人: 鲁旭

复核人: 王斌

苯酚含量测定 (一) — 比色法

1 原理

4-氨基安替比林与苯酚在碱性溶液中可被铁氰化钾等赤血盐类氧化剂偶合生成橘红色染料酚, 并在 546nm 波长下产生特征吸收峰, 在适宜范围内, 光吸收值与苯酚浓度呈线性的量效关系, 据此可进行苯酚含量测定。

2 设备和材料

2.1 设备 紫外分光光度计, 电子天平。

2.2 用具 100ml 量瓶, eppendorf 连续分液器, 50ml 分液器头, 50ml 离心管, 中号玻璃试管, 微量加样器, 200 μ l 枪尖。

2.3 试剂

2.3.1 pH 9.0 缓冲液 (A 液): 0.2mol/L 甘氨酸 50ml, 0.2mol/L NaOH 8.8ml, 加蒸馏水至 200ml。

2.3.2 氨基安替比林溶液 (B 液): 125mg 氨基安替比林溶于 100ml 的 A 液中。

2.3.3 六氰高铁酸钾 (C 液): 6.25g 六氰高铁酸钾溶于 100ml 水中。

根据待检样品数确定 A 液、B 液、C 液的配制量。

3 操作方法

3.1 待测样品 取供试品 0.2ml 加水至 100ml (500 倍稀释), 取此样品 10ml, 依次加入试剂 A、B、C 液各 5ml, 室温放置 10 分钟后, 546nm 波长下测吸光度。

3.2 标准曲线 称取 0.4g 苯酚溶于 100ml 水中,作为标准曲线的母液,取此溶液配制 2 μ g/ml、4 μ g/ml、8 μ g/ml、12 μ g/ml 四种浓度的标准品,其余操作同 3.1 项,可制得一标准曲线。

4 结果计算

以标准品的浓度及其对应的 546 波长下的吸光值绘制线性标准曲线,将每个待测样品的吸光值代入标准曲线的线性方程,求出苯酚含量,再乘以稀释倍数,即得到每个供试品的苯酚含量。

起草人:鲁旭

复核人:王斌

苯酚含量测定(二)—HPLC 法

1 原理

苯酚在紫外 270nm 波长处有最大吸收峰。不同浓度苯酚通过高效液相色谱柱后,形成与含量相关的吸收峰面积。通过苯酚含量和吸收峰的相关关系,利用苯酚含量标准品,可以测定供试品的苯酚含量。

2 设备和材料

2.1 设备 Agilent Hp1100 HPLC 系统、电子天平。

2.2 试剂 甲醇(HPLC 级)、85%磷酸(分析级)、苯酚对照品。

2.3 其他材料 Novo-Pak C-18 4 μ m 3.9mm \times 150mm 色谱柱或相当的色谱柱、10 μ l~1ml 移液器,10 μ l~1ml 枪尖,1ml 离心管。

3 操作方法

3.1 苯酚标准液配制 取苯酚精密称定,溶解并定容至量瓶中,得到一定浓度的苯酚标准液,量取苯酚标准液适量加超纯水配制浓度范围在 0~130 μ g/ml 的苯酚系列标准液。

3.2 供试品的溶液制备 将供试品上下颠倒几次混匀,取出 500 μ l,放至微量离心管中,每分钟 3000 转离心 3 分钟后,取出样品上清,与超纯水直接混合,稀释至一定浓度后检测。每个供试品平行测定 2 次。

3.3 HPLC 检测

3.3.1 运行参数:流动相:0.1%磷酸-甲醇(60:40);针冲洗液:超纯水-甲醇(60:40)。

3.3.2 柱温箱温度:30 $^{\circ}$ C;流速:1.0ml/min;注入体积:10 μ l;波长:271nm。

3.3.3 系统适用性检查:取配制浓度范围内的苯酚标准液连续进样 5 针,计算各响应值的拖尾因子和重复性。其中拖尾因子应在 0.95~1.05 之间,5 次测定值重复性的相对标准偏差应不大于 2.0%。

4 结果计算

以标准品的浓度及其对应的特征性吸收峰面积绘制标准曲线,根据每个待测样品的吸光峰

面积求出苯酚含量，再乘以稀释倍数，即得到每个制品的苯酚含量。

起草人：鲁旭

复核人：王斌

氯化钠或总氯离子含量测定法（电位滴定法）

1 原理

以硝酸银溶液滴定供试品中的氯离子，会生成氯化银沉淀，银离子电极可检测氯离子浓度变化，可根据电极电位的“突跃”判定滴定终点，并最终根据标准品的量可计算出供试品中氯化钠或总氯离子的含量。

2 设备和材料

2.1 设备：电位滴定仪。

2.2 试剂：0.1mol/L 硝酸银溶液、硝酸（52.5%）。

2.3 其他材料：氯化银电极，量筒，反应杯，ependorf 连续分液器，50ml 分液器头，50ml 离心管，微量加样器，1ml 枪尖。

3 操作方法

3.1 精密量取供试品 0.5ml，加水 50ml，加入 1 滴浓硝酸，混匀。

3.2 用 0.1mol/L 硝酸银滴定液在滴定仪上滴定至终点。

4 结果计算

计算公式：氯化钠或总氯离子（g/L）= $M_m \times V \times C_{onc}$ / 供试品体积

式中，V 为加入的硝酸银体积，以 ml 计算； C_{onc} = 硝酸银的浓度，以 N 计算； M_m = 分子量（氯化钠分子量 58.5g/mol，关于总氯含量测定，分子量是基于氯的， M_m = 35.5g/mol）。

起草人：鲁旭

复核人：王斌

氢氧化铝佐剂含量测定法 [电感耦合等离子体质谱仪 (ICP-MS)]

1 原理

含铝佐剂供试品经酸消解处理成溶液后，经气动雾化器以气溶胶的形式进入氩气为基质的高温射频等离子体中，经过蒸发、解离、原子化、电离等过程，转化为带正电荷的正离子，经离子采集系统进入质谱仪，质谱仪根据质荷比进行分离，质谱积分面积与进入质谱仪中的离子数成正比。即被测铝元素浓度与铝元素产生的信号强度 CPS 成正比，与标准系列比较定量。

2 设备和材料

2.1 设备 超纯水处理系统、美国热电 X-7 电感耦合等离子体质谱仪。

2.2 试剂 铝单元素溶液标准物质、高纯浓硝酸（优级纯以上，应符合 ICP-MS 仪器检测所需）。

3 操作方法

3.1 供试品溶液制备 供试品平衡到室温，混匀后按表 1 加入供试品与高纯浓硝酸到消解罐中进行消解。采用微波消解，按程序进行，消解结束后，消解罐中的消解后供试品按表 1 定容后待测。

表 1 消解的加样与定容

规格 (SQ-Uml)	样品号	消解加样量	消解加浓硝酸量	消解后定容量	稀释倍数
空白		2.00ml	2.00ml	50ml	—
100SQ		2.00ml	2.00ml	50ml	25
1000SQ		0.2ml	2.00ml	50ml	250
10000SQ		0.02ml	2.00ml	50ml	2500
100000SQ		0.005ml	2.00ml	50ml	10000

3.2 标准曲线的铝标准品配制 配制标准品溶液：可在室温放置 1 周。铝标准品为 100mg/L（中国计量科学研究院）。

表 2 标准品溶液配制

标样浓度 (mg/L, Al)	配制方法
0.00	硝酸 2ml+纯水 定容于 50ml
0.02	0.01ml (100mg/L) + 硝酸 2ml+纯水 定容于 50ml
0.05	0.025ml (100mg/L) + 硝酸 2ml+纯水 定容于 50ml
0.1	0.05ml (100mg/L) + 硝酸 2ml+纯水 定容于 50ml
0.15	0.075ml (100mg/L) + 硝酸 2ml+纯水 定容于 50ml
0.2	0.1ml (100mg/L) + 硝酸 2ml+纯水 定容于 50ml

3.3 微波消解程序 (表 3)

表 3 微波消解程序

起始时间 (start) / min	结束时间 (end) / min	微波消解炉功率 microwave power) / W	设定温度 (t) / °C
0	5	500	150
5	10	600	200
10	30	700	200
30	35	500	120

3.4 ICP-MS 测定 用仪器配套的调谐液调整仪器灵敏度、氧化物、双电荷、分辨率等各项指标,当仪器各项指标达到测定要求,编辑测定方法,将标准系列溶液引入仪器。进行相关数据处理,绘制标准曲线、计算回归方程。相同条件下,将试剂空白、供试品溶液分别引入仪器进行测定。

4 结果计算

依据标准曲线,计算出测定的供试品溶液中铝含量(ng/L),再乘以供试品稀释倍数,即为供试品中铝佐剂含量。

起草人:鲁旭

复核人:王斌

微生态活菌制品

简 述

微生态活菌制品系由人体内正常菌群成员或具有促进正常菌群生长和活性作用的无害外界细菌,经培养、收集菌体、干燥成菌粉后,加入适宜辅料混合制成。用于预防和治疗因菌群失调引起的相关症状和疾病。微生态活菌制品必须由非致病的活细菌组成,无论在生产过程、制品贮存和使用期间均应保持稳定的活菌状态。它可由一株、多株或几种细菌制成单价或多价联合制剂。根据其不同的使用途径和方法可制备成片剂、胶囊颗粒剂或散剂等多种剂型。

微生态活菌制品的成品检定项目包括:鉴别试验、外观、装量差异、崩解时限、干燥失重、粒度测定、活菌数测定、杂菌检查、安全试验。

鉴别试验

1 原理

利用革兰染色、显微镜镜检、生化反应、菌落形态观察等方法检查成品中所含的目的菌是否符合生产用菌种的特性。对于多价制品,则须逐一检查单价菌特性。检品中所含菌种的生长特性、染色镜检和生化反应,应符合规定。

2 材料和设备

2.1 稀释液:无菌 0.9%氯化钠溶液。

2.2 生化反应培养基 阿拉伯胶糖、木糖、鼠李糖、核糖、葡萄糖、甘露糖、果糖、半乳

糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖、纤维二糖、海藻糖、蜜二糖、棉子糖、松三糖、可溶性淀粉、甘露醇、山梨醇、七叶苷、水杨素、明胶液化、硝酸盐还原、菊糖。

2.3 染色液。

2.4 培育箱。

3 操作方法

3.1 核对制剂标签、批号。

3.2 分离培养 无菌取出供试品适量，加入少量适宜稀释液后，接种于固体分离培养基上，于适宜条件下培养。

3.3 分离纯化 上述培养物，观察菌落形态，挑选单颗菌落划线接种于固体分离培养基，于适宜条件下培养，做各项检查。

3.4 形态检查 新鲜纯培养物，涂片革兰染色，观察菌形。

3.5 生长特性比较 根据菌株特性进行，包括有氧厌氧，不同温度，不同盐度等。

3.6 生化特性检查 按供试品质量标准规定进行，选择不同种类糖，作糖发酵观察，同时进行明胶液化、硝酸盐还原、动力、溶血和触酶试验等，一般情况下应在试验后 1、3、7 天做结果观察记录。其中硝酸盐还原试验应在细菌接种后 48~72 小时内进行。

起草人：田万红

复核人：曾明 王斌

装（重）量差异检查法

1 原理

装量差异是通过称量法检查数个最小单位供试品的装（重）量均匀度，各剂型的装（重）量差异必须在规定范围内。

2 材料和设备

2.1 供试品每批至少取 2 个最小包装。

2.2 称量用具：镊子、小刷、称量纸等。

2.3 精密天平。

3 操作方法

3.1 片剂重量差异的限度 取供试品 20 片，精密称定总重量，求得平均片重后，再分别精密称定每片的重量，每片重量与平均片重相比较（凡无含量测定的片剂，每片重量应与标示片重相比较），超出限度的不得多于 2 片，并不得有 1 片超出限度 1 倍。

3.2 胶囊剂的装量差异限度 取供试品 20 粒，分别精密称定重量后，倾出内容物（不得损失囊壳）；硬胶囊用小刷或其他适宜用具拭净，再分别精密称定囊壳重量，求出每粒内容物的装量与平均装量。每粒的装量与标示装量相比较，超出装量差异限度的不得多于 2 粒，并不得有 1 粒超出限度 1 倍。

3.3 颗粒剂的装量差异限度 取供试品 10 包（瓶），除去包装，分别精密称定每包（瓶）

内容物的重量，求出每包（瓶）内容物的装量与平均装量。每包（瓶）装量应与平均装量相比较（凡无含量测定的颗粒剂，每包（瓶）装量应与标示装量比较），超出装量差异限度的不得多于2包（瓶），并不得有1包（瓶）超出装量差异限度1倍。凡规定检查含量均匀度的颗粒剂，可不进行装量差异的检查。

3.4 散剂装量差异限度 取散剂10包（瓶），除去包装，分别精密称定每包（瓶）内容物的重量，求出内容物的装量与平均装量，每包（瓶）装量与平均装量相比较[凡无含量测定的散剂，每包（瓶）装量应与标示装量相比较]，超出装量差异限度的散剂不得多于2包（瓶），并不得有1包（瓶）超出装量差异限度的1倍。凡规定检查含量均匀度的散剂可不进行装量差异的检查。

起草人：喻钢

复核人：曾明 王斌

崩解时限检查法

1 原理

崩解是固体药物在水中或人工胃液中崩散、变成细颗粒的过程。崩解时限检测人工模拟胃/肠环境下药物崩解的时间限度，是药物在人体胃/肠崩解速率的一个度量值，是固体药物的质量检查的指标之一。

2 材料和设备

1000ml 烧杯、250ml 烧杯、蒸馏水、盐酸溶液、人工肠溶液、崩解仪。

3 操作方法

3.1 片剂 取供试品6片，分别置吊篮玻璃管中，在自动崩解仪进行检查，各片均应在15分钟内全部崩解，如有1片崩解不完全，应另取6片按上述方法复试，均应符合规定。

3.2 胶囊剂

3.2.1 一般硬胶囊剂 取供试品6粒分别置于吊篮玻璃管中，在自动崩解仪进行检查，如样品漂浮于液面，可加挡板一块。胶囊应在30分钟内全部崩解。如有1粒不能完全崩解，应另取6粒，按上述方法复试，均应符合规定。

3.2.2 肠溶胶囊剂 按上述胶囊剂方法与装置，先在盐酸溶液（9ml 浓盐酸→1000ml 蒸馏水）中检查2小时，每粒胶囊壳均不应有裂缝或崩解现象；继将吊篮取出，用少量水洗涤后，每管各加入挡板一块，再按上述方法，改在人工肠溶液中进行检查，1小时内应全部崩解。如有1粒不能完全崩解，应另取6粒，按上述方法复试，均应符合规定。

起草人：喻钢

复核人：曾明 王斌

粒度测定法

1 原理

粒度测定是利用固定孔径的筛网，对颗粒剂和散剂药物粒径大小进行评测的方法。根据所用筛网的个数，可分为单筛分法或双筛分法。

2 材料和设备

- 2.1 筛子型号：一号筛，五号筛。
- 2.2 电子天平。

3 操作方法

准确称取供试品 5 包，置于一号筛和五号筛为一叠筛中，大一号筛上加盖，小五号筛下有密合的接受容器。保持水平状态过筛，左右往返，边筛边拍打 3 分钟，分别称量不能通过大、小号筛的颗粒或粉末，计算所占供试品量的百分比（%），应符合相关制品规定。

4 注意事项

供试品必须为均匀分散状态，不能有板结等影响过筛的状态。

起草人：喻钢

复核人：曾明 王斌

干燥失重测定法

1 原理

干燥失重是检测供试品在规定的温度下，经加热干燥脱水至恒重后所减少的重量，通常以百分率表示。本项测定中可以用干燥箱或水分仪加热干燥脱水，本处介绍使用水分仪的方法。

2 材料和设备

- 2.1 水分测定仪。
- 2.2 加样托盘。

3 操作方法

- 3.1 取供试品，混合均匀。如为较大结晶，应先迅速捣碎使成 2mm 以下的小粒。
- 3.2 设置测定温度为 105℃。
- 3.3 在加样托盘中加入样品，样品厚度不超过 3mm，运行仪器进行测定。

4 判断标准

供试品干燥失重减少重量应符合规定。

5 注意事项

供试品必须为均匀分散状态，不能有板结等影响干燥的状态。

起草人：喻钢

复核人：曾明 王斌

活菌数测定法

1 原理

利用梯度稀释法将活菌制剂中的细菌培养后计数，检测供试品中活菌数的一种方法。

2 材料和设备

- 2.1 选择性培养基。
- 2.2 稀释液：无菌 0.9%氯化钠溶液或其他适宜的稀释液。
- 2.3 玻璃器皿：100ml 三角瓶，内装玻璃珠（铺满瓶底）、试管、10ml、1ml 吸管、玻璃棒、平皿。
- 2.4 混匀器。
- 2.5 摇床。
- 2.6 培育箱。
- 2.7 100 μ l 微量加样器（包括尖滴头）。
- 2.8 厌氧罐或厌氧培养箱（厌氧菌需要）。
- 2.9 天平。

3. 操作方法

3.1 无菌取 3.0g 供试品，移入 27.0ml 稀释液中，充分摇匀后，作 10 倍系列稀释（最终稀释度以平皿菌落数为 10~300 个为宜），取最终稀释度悬液 0.1ml，滴加在培养基平皿上，一式 3 份。用玻璃棒涂布均匀，于适宜条件下培养。取出平皿，菌落计数。

3.2 计数方法

$$\text{CFU/g} = \frac{3 \text{个平皿菌落总数} \times \text{稀释度}}{3} \times 10 \times \text{稀释度}$$

4 判断标准

每克供试品中的活菌数，应符合规定。多价制品应分别测定各单价活菌数。

起草人：田万红

复核人：曾明 王斌

杂菌检查法

1 原理

微生态制品本身是活菌制剂，其中如果含有杂菌甚至致病菌，将对人体健康产生严重威胁。因此，杂菌检查是衡量微生态制品安全性的一项重要标准。通过分类培养计数的方式对制品中的各类杂菌进行检测。

标准规定制品中不得检出大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、志贺菌、沙门菌和金黄色葡萄球菌等致病性杂菌。非致病性杂菌不超过 1000CFU/g，真菌数不超过 100CFU/g。

2 材料和设备

胆盐乳糖增菌液，伊红美兰（EMB）琼脂，SS 琼脂，NAC 培养基（液体、固体），7.5%NaCl 肉汤，甘露醇高盐琼脂，虎红琼脂，无菌生理盐水，玻璃器皿，以及 1ml，10ml 吸管、中、小试管、平皿、L 型玻璃棒，孵箱。

3 操作方法

3.1 大肠埃希菌检查

3.1.1 培养基 胆盐乳糖增菌液（商品）、伊红美兰（EMB）琼脂（商品）。

3.1.2 操作步骤

3.1.2.1 增菌培养 无菌称取供试品 1g，加到备妥的无菌胆盐乳糖增菌液 9ml 中，37℃，培养 18~24 小时。

3.1.2.2 特异培养 将上述增菌液摇匀，取 100 μ l 滴加到备妥的 EMB 琼脂平皿上，以 L 玻璃棒涂匀，一式 3 份。同时以标准大肠埃希菌作为阳性对照菌于另一 EMB 平皿上划线，置 37℃，培养 18~24 小时。

3.1.2.3 结果观察 阳性对照平皿应长出紫黑色或中心深紫色、圆形、稍凸起、边缘整齐、表面光滑、常有金属光泽的大肠埃希菌菌落。待检平皿上若未见菌落生长，表明未检出大肠埃希菌；若有菌落生长，应与阳性对照的菌落作比较，并做革兰染色镜检，观察菌形和血清学反应等，鉴别是否为供试品中的目的菌或大肠埃希菌。

3.1.3.4 结果判定 若经上述检定确认为大肠埃希菌污染，即为不合格。

3.2 志贺、沙门菌检查

3.2.1 培养基 胆盐乳糖增菌液（商品）、SS 琼脂（商品）。

3.2.2 操作步骤

3.2.2.1 增菌培养 同 3.1.2.1 项。

3.2.2.2 特异培养基 将上述增菌液摇匀，取 100 μ l 于已备妥的 SS 琼脂平皿上，以 L 玻璃棒涂匀，一式 3 份同时以标准志贺、沙门菌作为阳性对照菌于 SS 平皿上划线接种，37℃，培养 18~24 小时。

3.2.2.3 结果观察 阳性对照沙门菌平皿上生长出菌落多无色透明或半透明、圆形的、光滑、稍隆起，菌落中心呈黑褐色。阳性对照志贺菌的菌落为无色半透明、圆形、微凸、光滑。

待检平皿上若未见菌落生长，表明未检出志贺、沙门菌；一般观察结果为培养 24 小时，

48 小时各观察结果 1 次,若有菌落生长,应做菌落形态、革兰染色镜检,观察菌型和血清学反应等,鉴别是否为供试品中的目的菌或志贺、沙门菌。

3.2.2.4 结果判定 若经上述鉴定确认为志贺、沙门菌污染,即为不合格。

3.3 铜绿假单胞菌检查

3.3.1 培养基 NAC 液体培养基(商品)、NAC 固体培养基(商品)。

3.3.2 操作步骤

3.3.2.1 增菌培养 无菌称取供试品 1g,加到 9ml NAC 液体培养基中,37℃,培养 18~24 小时。

3.3.2.2 特异培养 将上述增菌液轻轻摇动,取 100μl 滴加于已备妥的 NAC 琼脂平皿上,以 L 玻璃棒涂匀,一式 3 份。同时以铜绿假单胞标准株作为阳性对照菌于另一 NAC 琼脂平皿上划线接种,37℃,培养 18~24 小时。

3.3.2.3 结果观察 阳性对照平皿上应长出绿色色素的菌落,可使培养基呈绿色。

待检平皿上若未见菌落生长,表明未检出铜绿假单胞菌;若菌落生长,应做菌落形态、革兰染色镜检,观察菌形和血清学反应等,鉴别是否为供试品中的目的菌或是铜绿假单胞菌。

3.3.2.4 结果判定 若经上述检定确认为铜绿假单胞菌污染,即为不合格。

3.4 金黄色葡萄球菌检查

3.4.1 培养基 7.5% NaCl 肉汤、甘露醇高盐琼脂(商品)。

3.4.2 操作步骤

3.4.2.1 增菌培养 无菌称取供试品 1g,加到已备妥的 7.5% NaCl 肉汤培养基 9ml 中,37℃ 培养 18~24 小时。

3.4.2.2 特异培养 将上述增菌液摇匀,取 100μl 滴加到已备妥的甘露醇高盐琼脂平皿中,以 L 棒涂匀,一式 3 份。同时以标准金黄色葡萄球菌株作为阳性对照菌在另一平板上划线接种,37℃ 培养 18~24 小时。

3.4.2.3 结果观察 阳性对照平皿上由于金黄色葡萄球菌产生金黄色素,而呈金黄色菌落。

待检平皿上若未见菌落生长,表明未检出金黄色葡萄球菌;若有菌落生长,应做菌落形态、革兰染色镜检,观察菌形和血清学反应等,鉴别是否为供试品中的目的菌或金黄色葡萄球菌。

3.4.2.4 结果判定 若经上述鉴定确认为金黄色葡萄球菌污染,即为不合格。

3.5 霉菌检查

3.5.1 培养基:虎红琼脂培养基(商品)。

3.5.2 操作步骤:无菌称取供试品 1g,加入 9ml 生理盐水或其他稀释液中,取 100μl,加到已备好的虎红琼脂平板上,一式 3 份,以 L 棒涂匀后,放室温(20~25℃)培养 96 小时,每天观察、记录虎红琼脂平板上生长的霉菌菌落数。

3.5.3 记数结果计算 以 3 个平板生长的菌落平均数计算

$$\text{霉菌数} = \frac{3 \text{个平板菌落总数}}{3} \times 100 = \text{个/g}$$

3.5.4 结果判定 若经上述检定,霉菌数超过 100 个即为不合格。

3.6 非致病性杂菌检查方法 选用能抑制目的菌的选择性培养基如 EMB 或甘露醇高盐培养基等进行其他杂菌检查。具体操作方法同 1~4 项。经检定杂菌超过 1000 个即为不合格。

起草人:田万红

复核人:曾明 王斌

安全试验检查法

1 原理

安全试验是对微生态制品中安全性的体内评价。通过灌胃法检测其是否对小鼠短期的正常生长产生影响。局部给药的微生态制品还检测其对动物的相应器官是否有刺激作用。

2 材料和设备

- 2.1 动物：健康清洁级小鼠，体重 18~22g。
- 2.2 无菌 0.9%氯化钠溶液。
- 2.3 灌胃用注射器（包括灌胃用插管）。
- 2.4 天平。

3 操作方法

3.1 动物 采用健康 KM（SPF 级）小鼠，体重 18~22g，每批供试品用 5 只小鼠，试验前称每只小鼠体重，并做记录。

3.2 供试品 取 2g 供试品（菌粉或片剂），溶解在 8ml 无菌 0.9%氯化钠溶液中，充分混匀。

3.3 试验方法 将上述制品溶液经口对每只小鼠灌胃 0.5ml，每天 1 次，连续 3 天，第 7 天时再称体重，并做记录。

3.4 结果判定

3.4.1 自第 1 天灌胃起，连续观察 7 天，小鼠应健康存活、体重增加，判为合格。如不合格，可另选 10 只小鼠复试 1 次，判定标准同前。

3.4.2 阴道微生态活菌制品自给药第 1 天起，连续观察 7 天，小鼠应健康存活、体重增加，阴道局部无红肿、分泌物等症状，判为合格。

起草人：喻钢

复核人：曾明 王斌

注射用 A 型肉毒毒素

简 述

肉毒毒素是已知毒性最强的生物毒素，对小鼠半数致死量（LD₅₀）约为 $3 \times 10^{-5} \sim 3 \times 10^{-4} \mu\text{g}$ ，相当于氰化钾毒性的 10000 倍。其通过作用于周围运动神经末梢的神经肌肉接头，抑制突触前

膜乙酰胆碱（一种重要的神经递质）的释放，引起肌肉松弛性麻痹，严重者可致呼吸衰竭。但是，极微量的肉毒毒素也可产生药用效果，如解除肌肉痉挛等。注射用A型肉毒毒素即是将A型肉毒结晶毒素经稀释冻干（或真空干燥）制备而成，其适应证主要包括眼睑/面肌痉挛、斜视、痉挛性斜颈，以及暂时性改善中度至重度眉间纹（除皱）等。1989年12月，美国FDA首次批准治疗用A型肉毒毒素（BOTOX）上市，目前全球上市的A型肉毒毒素制品已有十余种。国内已批准使用的注射用A型肉毒毒素有两种，分别为爱尔兰Allergan公司生产的“保妥适（BOTOX）”和兰州生物制品研究所有限责任公司生产的“衡力”。本品自2000年起收载于《中国生物制品规程》，当时名称为“治疗用A型肉毒毒素”，从《中国药典》2005年版三部起，更名为“注射用A型肉毒毒素”。

注射用A型肉毒毒素的生产工艺一般包括细菌发酵、毒素纯化、结晶、稀释配制、除菌过滤等步骤。纯化手段可包括等电点沉淀、硫酸铵盐析、柱色谱等。整个生产过程需遵循GMP规范，在严格控制条件下进行。由于肉毒毒素的剧毒性，生产过程中应注意生物防护，并需严格控制对生产用菌种和原液的管理。

在不同的生产阶段，注射用A型肉毒毒素的检定内容有所区别，根据《中国药典》2015年版三部规定，结晶毒素检定项目包括显微镜检、毒力测定、纯度、特异性检查和蛋白质图谱，原液检定项目包括毒力测定、纯度和特异性检查，半成品仅进行无菌检查，成品检定包括5个方面：①鉴别试验，同结晶毒素和原液的特异性检查，即证明制品中所含的肉毒毒素为A型；②物理检查，包括外观检查、装量差异、可见异物和渗透压摩尔浓度；③化学检查，包括水分和pH值；④效价测定，采用小鼠LD₅₀法，测定制品的毒性大小（即有效性）；⑤安全性相关，包括无菌检查和细菌内毒素检查。进口制品的质量标准和检定方法按照其批准的进口药品注册标准进行，整体上与药典规定基本一致，但在某些具体的检定方法上略有不同。

鉴别试验

1 原理

将供试品与A、B、C、D、E、F型诊断血清结合后注射小鼠，如与某型诊断血清发生中和反应，则不会引起小鼠死亡，否则会引起小鼠死亡，以此判断供试品中是否含有A型肉毒毒素。

2 材料和设备

2.1 仪器与设备：37℃温箱。

2.2 试剂

2.2.1 稀释液：0.9%氯化钠溶液、注射用水。

2.2.2 冻干肉毒诊断血清：A、B、C、D、E、F型。

2.3 实验动物：26~30日龄SPF级昆明小鼠。

3 操作方法

3.1 诊断血清稀释 取各型（A、B、C、D、E、F）冻干肉毒诊断血清各1支，每支加注射用水1ml溶解，备用。

3.2 混合 分别于各血清管中加1ml含100LD₅₀左右的供试品；另取1ml供试品加入1ml 0.9%氯化钠溶液混合后，同置37℃结合45分钟；再取1ml供试品加入1ml 0.9%氯化钠溶

液混合后，煮沸 20 分钟，作为灭活对照。

3.3 注射 各组分别腹腔注射体重小鼠 2~3 只，每只注射 0.5ml，观察 4 天，记录动物死亡情况。

4 结果判定

除注射加入 A 型肉毒诊断血清及灭活对照样品的小鼠存活外，其余小鼠应在 4 日内死亡，表明供试品所含肉毒毒素为 A 型。

5 注意事项

因不同型别诊断血清与肉毒毒素间可能发生交叉反应，如发生动物异常死亡情况，应增加动物量进行重试。

起草人：张华捷

复核人：马霄

效价测定法

1 原理

将系列稀释的供试品及对照品分别注射小鼠，小鼠的死亡呈明显的剂量-反应关系，将两者的半数致死率作平行线分析，计算供试品/对照品的相对效价，从而推算供试品的初始效价。

2 材料与设备

2.1 稀释液：0.9%氯化钠溶液。

2.2 试验动物：选用 26~30 日龄 SPF 级雌性昆明小鼠。

3 操作方法

3.1 取供试品和参考品各 10~20 瓶，每瓶分别用 2.5ml 0.9%氯化钠溶液复溶后混合均匀。

3.2 将复溶液用生理氯化钠溶液稀释至浓度约为 10U/ml 的母液。

3.3 将供试品与参考品分别按相同的等比间隔稀释至不少于 5 个稀释度，使中间稀释度样品在注射后约能使半数动物死亡（稀释方案参见表 1）。

表 1 参考稀释方案

管号	母液 (ml)	生理盐水 (ml)	理论浓度 (U/ml)
1	2	3.8	3.45
2	2	5	2.86
3	1.5	4.8	2.38
4	1.5	6	2.00
5	1	5	1.67
6	1	6.2	1.39
7	1	7.7	1.15

注：稀释方案可适当调整，可从中选择其中 5 个以上稀释度。

3.4 用稀释好的供试品和参考品溶液分别注射试验动物，每个稀释度注射 10 只，每只腹腔注射 0.5ml。

3.5 连续观察 4 天，每日记录小鼠死亡结果，根据第 4 天动物存活率的剂量反应曲线，用平行线法计算结果。

4 结果判定

4.1 试验成立应具备的条件

4.1.1 参考品和供试品的最低稀释度 70%以上动物应死亡。

4.1.2 参考品和供试品的最高稀释度 70%以上动物应存活。

4.1.3 每批供试品或参考品应至少含 4 个有效稀释度，并且除最低和最高稀释度外，还应至少含一个半数及以上动物死亡和半数及以下动物死亡的稀释度。

4.1.4 供试品和参考品的剂量反应曲线在平行线及直线性上应无显著性差异。

4.2 判定试验成立后，用适当的统计分析软件计算样品的效价，即 LD_{50} （单位）数， $1LD_{50} = 1U$ 。供试品的效价应为标示值的 80%~120%。

5 注意事项

5.1 对照品的 LD_{50} 直接计算结果应在标示值的 80%~120%。

5.2 各稀释组间不能出现 2 只以上不符合剂量-反应关系的死亡。

5.3 不能出现非肉毒毒素中毒等非特异死亡情况，否则试验需重试。

起草人：张华捷

复核人：马霄

结核菌素纯蛋白衍生物和卡介菌 纯蛋白衍生物

简 述

结核菌素纯蛋白衍生物和卡介菌纯蛋白衍生物分别由结核分枝杆菌强毒株（H37R_v）和卡介菌培养滤液中提取的蛋白制成。两制品除生产用菌种不同外，其生产工艺基本一致。并且两制品有着共同的抗原成分，能在机体上引起交叉的迟发型变态反应。两制品主要用于结核病的临床诊断及流行病学监测，卡介苗接种对象的选择及卡介苗接种后机体免疫反应的监测。

结核菌素纯蛋白衍生物和卡介菌纯蛋白衍生物应依据现行版《中国药典》或其他国家药品标准进行测定，应符合相关要求。

结核菌素纯蛋白衍生物和卡介菌纯蛋白衍生物的检定内容按照生产阶段分为原液、半成品、成品。原液可为冻干或液体制剂，冻干原液检定主要包括外观、复溶时间、水分、蛋白质含量、多糖与核酸含量、效价测定、无菌检查、无分枝杆菌试验、致敏效应试验等，液体原液则无复溶时间和水分检定项；半成品检定主要包括无菌检查等；成品检定项目主要有鉴别试验、外观、装量、pH值、苯酚含量、效价测定、无菌检查、异常毒性检查等。其中原液的效价测定、无分枝杆菌试验和致敏效应试验，以及成品的鉴别试验和效价测定为该类产品特异性检测项目。成品的鉴别试验和效价测定检定原理和实验步骤基本相同，因此合并描述。

效价测定法（原液）

1 原理

结核菌素纯蛋白衍生物或卡介菌纯蛋白衍生物皮肤试验的反应原理是迟发型细胞过敏反应，即Ⅳ型变态反应。豚鼠被结核杆菌或卡介苗致敏后，会产生相应的致敏T淋巴细胞，具有对结核杆菌或卡介苗的识别能力。当再次注入结核菌素或卡介菌纯蛋白衍生物时，致敏T淋巴细胞受相同抗原再次刺激会释放出多种可溶性淋巴因子，导致血管通透性增加，巨噬细胞在局部集聚、浸润，局部出现红肿或硬结的阳性反应。

2 材料和设备

2.1 材料

2.1.1 实验动物：400~600g 已致敏豚鼠。

2.1.2 试剂：0.01mol/L PBS 稀释液（pH 7.2~7.4，含 0.0005%聚山梨酯 80 及 3.0g/L 苯酚）、灭菌注射用水。

2.1.3 一般性材料：1ml 吸管、医用酒精棉球、1ml 注射器、测量卡尺。

2.1.4 标准品：结核菌素纯蛋白衍生物（液体）国家标准品（适宜稀释度）或卡介苗纯蛋白衍生物（液体）国家标准品（适宜稀释度）。

2.2 设备 电子天平。

3 操作方法

3.1 供试品和标准品稀释 随机取结核菌素纯蛋白衍生物或卡介菌纯蛋白衍生物原液若干瓶，冻干品每瓶需加入 0.5ml 灭菌注射用水复溶，液体制剂则直接使用。以稀释液将供试品和标准品稀释至所需稀释度。

3.2 皮试试验 取体重 400~600g 已致敏豚鼠至少 4 只，将豚鼠背部脊柱两侧去毛（手动拔毛或者电动剃毛器剃毛）。豚鼠注射时左手食指及拇指捻起皮肤，右手拿着吸好样品的 1ml 注射器于背部脊柱两侧相对部位，将针头刺入食指与拇指之间的部位，分别缓缓皮内注射各稀释度供试品和标准品 0.1ml 或 0.2ml，注入样品后稍转动一下，将针头拔出，注射部位应凸起。

3.3 皮试反应的观察和测量 注射供试品以及标准品 24 小时和（或）48 小时后观察并用

卡尺测量每只豚鼠注射部位硬结反应的纵径和横径。测量前首先找到注射针眼，然后用食指从红晕周边向中心轻轻触摸，找到硬结边缘，确定横径和纵径测量点，用卡尺测量。如硬结边缘不清楚，需要轻触边缘后，用笔作标记，再进行测量。

4 结果计算

每只豚鼠注射部位硬结反应的纵径与横径值相加除以 2 即为平均硬结反应。

5 结果判定

5.1 动物法 于注射后 24、48 小时各观察结果局部硬结的纵径与横径（可根据 48 小时的反应结果判定），计算每个稀释度 2 天的总和（也可计算 2 天的平均面积），并求其比值，每个稀释度与对应标准品比值 0.8~1.2 为合格。如不符合上述要求，可调整稀释度后再测定效价，直至符合要求。

5.2 稀释度的选择 稀释度的选择应能使注射后 24 小时所产生的局部硬结反应直径为 8~25mm，且供试品和标准品 3 个稀释度的剂量对数反应曲线应基本平行。如供试品效价与标准品效价不一致，可用同样方法重试一次，并算出相当于标准品的效价进行调整，调整后再重新抽样测定效价，直至符合要求。

6 注意事项

- 6.1 如需要多点注射，应采取轮圈法，避免豚鼠不同部位造成硬结反应大小的差异。
- 6.2 观察和测量硬结反应时应光线充足，并使豚鼠肌肉自然放松，保证结果的准确性。

起草人：卢锦标 都伟欣 苏城
复核人：赵爱华

无分枝杆菌检查法（原液）

1 原理

结核菌素纯蛋白衍生物或卡介菌纯蛋白衍生物在制备过程中可能存在活的分枝杆菌，采用直接接种法检定原液中是否有活的分枝杆菌存在，可确保该制品的安全性。

2 材料和设备

2.1 材料

- 2.1.1 试剂：灭菌注射用水。
- 2.1.2 一般性材料：1ml 吸管、15ml 离心管。
- 2.1.3 培养基：罗氏鸡蛋培养基。

2.2 设备 生物安全柜、恒温恒湿培养箱。

3 操作方法

随机取结核菌素纯蛋白衍生物或卡介菌纯蛋白衍生物原液若干瓶。冻干品每瓶加入 0.5ml 灭菌注射用水复溶，然后混合。液体制剂则直接使用，分别量取 1ml 样品，接种于 10 支罗氏

鸡蛋培养基，每支罗氏鸡蛋培养基接种约 0.1ml。接种后的罗氏鸡蛋培养基置于 37℃ 恒温恒湿培养箱培养 4 周。

4 结果计算

37℃ 培养 4 周后，观察每支罗氏鸡蛋培养基情况。

5 结果判定

每支罗氏鸡蛋培养基应无分枝杆菌生长。

6 注意事项

6.1 应在 BSL-Ⅱ 级实验室操作。

6.2 可设置阳性对照管，如无致病性的草分枝杆菌按 10CFU/管接种于培养基，1 周内应生长。

起草人：苏城 沈小兵 卢锦标

复核人：赵爱华

致敏效应试验（原液）

1 原理

将 PPD 原液注射豚鼠，观察其是否诱发迟发型过敏反应判断其是否含有致敏原。

2 材料和设备

2.1 材料

2.1.1 实验动物：300~400g SPF 级豚鼠。

2.1.2 试剂：0.01mol/L PBS 稀释液（pH 7.2~7.4，含 0.0005% 聚山梨酯 80 及 3.0g/L 苯酚）、灭菌注射用水。

2.1.3 一般性材料：医用酒精棉球、1ml 注射器。

2.2 设备 电子天平。

3 操作方法

3.1 供试品稀释 取结核菌素纯蛋白衍生物或卡介菌纯蛋白衍生物原液 1 瓶，冻干品需加入 0.5ml 灭菌注射用水复溶，液体制剂则直接使用。以稀释液将供试品稀释至 100μg/ml（5000IU/ml）。

3.2 动物致敏 试验组、对照组各选取 300~400g SPF 级豚鼠 3 只，其中试验组每只豚鼠皮内注射 0.1ml 供试品稀释液，对照组每只豚鼠皮内注射 0.1ml 稀释液，均共 3 次，每次间隔 5 天。

3.3 动物皮试 在第 3 次致敏后 15 天，试验组与对照组豚鼠皮内各注射 0.1ml 含 500IU 的供试品。

4 结果计算

动物皮试后，连续3天观察试验组和对照组豚鼠反应情况。

5 结果判定

试验组动物反应无异常，与对照组比较应无明显区别。

6 注意事项

豚鼠致敏和皮试时，应避免在同一位置注射供试品。

起草人：杨蕾 苏城 卢锦标

复核人：赵爱华

鉴别试验/效价测定法（成品）

1 原理

结核菌素纯蛋白衍生物或卡介苗纯蛋白衍生物皮肤试验的反应原理是迟发型细胞过敏反应，即Ⅳ型变态反应。豚鼠被结核杆菌或卡介苗致敏后，会产生相应的致敏T淋巴细胞，具有对结核杆菌或卡介苗的识别能力。当再次注入结核菌素或卡介苗纯蛋白衍生物时，致敏T淋巴细胞受相同抗原再次刺激会释放出多种可溶性淋巴因子，导致血管通透性增加，巨噬细胞在局部集聚、浸润，局部出现红肿或硬结的阳性反应。

2 材料和设备

2.1 材料

2.1.1 实验动物：400~600g 已致敏豚鼠。

2.1.2 一般性材料：医用酒精棉球、1ml 注射器、测量卡尺。

2.1.3 标准品：结核菌素纯蛋白衍生物国家标准品或卡介苗纯蛋白衍生物国家标准品（仅效价测定用）。

2.2 设备 电子天平。

3 操作方法

3.1 皮试试验 豚鼠致敏后的第5周即可进行结核菌素纯蛋白衍生物或卡介苗纯蛋白衍生物的皮试试验。取经结核杆菌灭活菌液（结核菌素纯蛋白衍生物检定用）或者卡介苗活菌菌液致敏的400~600g豚鼠（卡介苗纯蛋白衍生物检定用）至少4只，将豚鼠背部脊柱至少一侧去毛（手动拔毛或者电动剃毛器剃毛）。豚鼠注射时左手食指及拇指捻起皮肤，右手拿着吸好样品的1ml注射器于去毛后背部脊柱相对部位，将针头刺入食指与拇指之间的部位，分别缓缓皮内注射供试品和（或）标准品各0.2ml，注入样品后稍转动一下，将针头拔出，注射部位应凸起。

3.2 皮试反应的观察和测量 注射供试品和（或）标准品24小时和（或）48小时后观察并用卡尺测量每只豚鼠注射部位硬结反应的纵径和横径。测量前首先找到注射针眼，然后用食

指从红晕周边向中心轻轻触摸，找到硬结边缘，确定横径和纵径测量点，用卡尺来测量。如硬结边缘不清楚，需要轻触边缘后，用笔作标记，再进行测量。

4 结果计算

每只豚鼠注射部位硬结反应的纵径与横径值相加除以 2 即为平均硬结反应。

5 结果判定

5.1 鉴别试验 24 小时后豚鼠的平均硬结反应直径均应不小于 5mm。

5.2 效价测定 计算所有豚鼠平均硬结反应的累计值(可计算 24 小时和 48 小时的总和累计值，也可以只计算 48 小时的累计值)，并求其与标准品累计值的比值，应为 0.8~1.2。

6 注意事项

6.1 如需要多点注射，应采取轮圈法，避免豚鼠不同部位造成硬结反应大小的差异。

6.2 观察和测量硬结反应时应光线充足，并使豚鼠肌肉自然放松，保证结果的准确性。

起草人：都伟欣 卢锦标 沈小兵
复核人：赵爱华

中国食品药品检验检测技术系列丛书

中国药品检验标准操作规程 2019年版

药品检验仪器操作规程及使用指南

生物制品检验技术操作规程

药用辅料和药品包装材料检验技术

医疗器械安全通用要求检验操作规程

体外诊断试剂检验技术

食品检验操作技术规范（理化检验）

食品检验操作技术规范（微生物检验）

实验动物检验技术

全球化妆品技术法规比对*

化妆品安全技术规范*

* 已在其他出版社出版。

