

## 安全监测

## 两步凝胶法限量检查中药注射剂中的大分子蛋白质\*

白光灿, 马恺悦, 王安冬, 卫亚洁, 张泽坤, 郭慧清, 马长华\*\*

(北京中医药大学中药学院, 北京 100102)

**摘要** 目的: 建立中药注射剂中大分子蛋白的葡聚糖凝胶色谱法与凝胶高效液相色谱法相结合的两步凝胶限量检查方法, 为中药注射剂中大分子蛋白的检测提供方法和实验依据。方法: 两步凝胶法第一步为交联葡聚糖凝胶柱色谱分析法, 以溶菌酶对照品的出峰时间为临界点, 收集临界点之前的中药注射剂洗脱液制备第二步的供试品溶液; 第二步为凝胶高效液相色谱法, 将制备得到的供试品溶液进样分析。色谱分析条件: 色谱柱为 TSK-Gel G2000SWXL (7.8 mm × 300 mm, 5 μm), 流动相为 0.1 mol · L<sup>-1</sup> 硫酸钠和 0.1 mol · L<sup>-1</sup> 磷酸缓冲盐等体积混合液 (pH 6.7), 等度洗脱, 流速为 0.8 mL · min<sup>-1</sup>, 进样量 100 μL, 检测波长 280 nm, 柱温 25 °C。结果: 溶菌酶对照品进样量在 0.05~5 μg ( $R^2=0.9990$ ) 范围内呈良好的线性关系, 精密度、稳定性、重现性均良好, 平均回收率为 88.9%, RSD 为 4.9%。本实验共检测了 8 个不同品种共 18 个批次的中药注射剂, 不同中药注射剂品种中均能检出大分子蛋白的存在, 虽含量略有差别, 但均符合本实验设定的 20 μg · mL<sup>-1</sup> 的检查限量。结论: 本实验建立的两步凝胶法准确可靠, 解决了中国药典方法的假阳性问题, 可用于中药注射剂中大分子蛋白的限量检查, 为中药注射剂中大分子蛋白检查提供了更有效的方法, 为进一步保证中药注射剂的药品质量和临床用药安全奠定了基础。

**关键词:** 两步凝胶法; 中药注射剂; 蛋白质检查; 葡聚糖凝胶色谱法; 溶菌酶

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2018)02-0313-06

doi: 10.16155/j.0254-1793.2018.02.18

## Determination of macromolecular protein in traditional Chinese medicine injection by two-dimensional gel method\*

BAI Guang-can, MA Kai-yue, WANG An-dong, WEI Ya-jie,

ZHANG Ze-kun, GUO Hui-qing, MA Chang-hua\*\*

(School of Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

**Abstract Objective:** To establish a two-dimensional gel method for the determination of macromolecular protein content in traditional Chinese medicine injections, and to provide a method and experimental basis for the detection of macromolecular proteins in traditional Chinese medicine injections. **Methods:** The first step is the Sephadex

\* 国家自然科学基金资助项目 (81274070)

\*\* 通信作者 Tel: (010) 84738603; E-mail: machanghua60@sina.com

第一作者 Tel: 13683676581; E-mail: baiguangcan@bucm.edu.cn

chromatography method, taking the retention time of lysozyme reference substance as the critical point, collecting the eluent of traditional Chinese medicine injection before the critical point as the test solution. In the second step, a TSK-Gel G2000SWXL (7.8 mm × 300 mm, 5 μm) column was used for the determination of macromolecular protein at 25 °C. The injection volume was 100 μL. A gradient was applied, using 0.1 mol · L<sup>-1</sup> sodium sulfate and 0.1 mol · L<sup>-1</sup> phosphate buffer salt in water as mobile phase. The flow rate was 0.8 mL · min<sup>-1</sup> and the detection wavelength was 280 nm. **Results:** A good linear relationship was showed when injection of lysozyme reference was in the range of 0.05–5 μg ( $R^2=0.999\ 0$ ). The precision, stability and reproducibility were good. The average recovery were 88.9% and the RSD was 4.9%. A total of 18 batches of 8 different Chinese medicine injections were tested in the experiment. The macromolecular protein was detected in all kinds of Chinese herbal medicine. The contents of macromolecular protein were slightly different, but all of them were under the limit of 20 μg · mL<sup>-1</sup>. **Conclusion:** The two-dimensional gel method established in this experiment was able to avoid the false positives of sulfosalicylic acid turbidity method (described in Chinese pharmacopoeia) and could be used for the determination of macromolecular protein content in traditional Chinese medicine injection. It provides a more effective method for the examination of macromolecular protein in traditional Chinese medicine injections, and lays the foundation for ensuring the quality of Chinese medicine injections.

**Keywords:** two-dimensional gel method; traditional Chinese medicine injection; protein determination; Sephadex chromatography; lysozyme

中药注射剂是从中药材中提取、纯化有效成分后,经人工配制成的溶液、乳液、粉末或浓溶液无菌制剂<sup>[1]</sup>。中药注射剂的不良反应报告逐年增多,尤以过敏反应居多,虽然其致敏机制尚无定论,但注射剂中所含的蛋白质等可作为致敏源进而引发过敏反应的观点已经得到广泛认可<sup>[2-5]</sup>。中药注射剂中蛋白质的检查始于2000年版中国药典一部<sup>[6]</sup>,直至最新的2015年版中国药典均明确规定,中药注射剂除另有规定外,均应对蛋白质进行检查。现2015年版中国药典采用磺基水杨酸比浊法检查中药注射剂中的蛋白质<sup>[7]</sup>,该法虽简单易行、快速直观,但灵敏度低,专属性差,常会出现假阳性干扰,如不饱和脂肪酸、环状饱和脂肪酮等中药有效成分和聚山梨酯、司盘等增溶剂都会造成假阳性结果<sup>[8-11]</sup>。因此,建立杂质蛋白灵敏、准确的检测方法已成为中药注射剂质量控制亟需解决的难题之一。

段为刚<sup>[12]</sup>建立了一种滤过吸附法,采用PDVF膜吸附微量蛋白质后,用考马斯亮蓝进行显色。该方法检测限低,不足之处在于需要特制的小空滤器装置。王雪<sup>[13]</sup>将4种常用的蛋白质测定方法应用于中药注射剂中大分子蛋白的检查,结果表明,磺基水杨酸法灵敏度不高,考马斯亮蓝法和福林酚法专属性较差,体积排阻色谱法灵敏度和专属性相对良好。

凝胶过滤色谱法(gel filtration chromatography, GFC)是20世纪60年代发展起来的一种色谱分离方法。其以多孔凝胶作固定相,依据样品分子量大小达到分离目的<sup>[14]</sup>。近年来,凝胶色谱法准确性高,重现性好,自动化程度高,科学快速,能真实表示出蛋白质和肽类的分子量分布,可以分析鉴定产品纯度,被广泛应用于蛋白质的分离和检测工作中。

针对中药注射剂中各成分性质差异大,组成复杂等特点,本实验建立了葡聚糖凝胶色谱法(sephadex chromatography, SC)与凝胶高效液相色谱法(gel high performance liquid chromatography, Gel-HPLC)相结合的两步凝胶色谱法限量检查中药注射剂中大分子蛋白,并与中国药典规定方法进行了对比。为更快速、准确地检测中药注射剂中大分子蛋白提供了新方法,从而为中药注射剂更准确、全面地质量控制提供实验参考。

## 1 仪器与试剂

### 1.1 仪器

BS110S型电子天平( $d=0.1$  mg,北京赛多利斯仪器系统有限公司);SZ-97型三重自动蒸馏水机(上海亚荣生化仪器厂);WGZ-1型浊度计(上海昕瑞仪器仪表有限公司);KQ-400KDE型高功率数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。HL-2S恒流

泵(上海沪西分析仪器有限公司);HD-4 电脑核酸蛋白检测仪(上海沪西分析仪器有限公司)。

Waters 1525 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司);Waters 2998 二极管阵列检测器;Waters 2707 自动进样器;Waters 038040 柱温箱;Breeze 2 HPLC 色谱工作站。

## 1.2 试药

双黄连注射液(黑龙江省格润药业有限责任公司;批号:20120906、20130314);天麻素注射剂(济南利民制药有限责任公司;批号:12110939、12070815);舒血宁注射液(黑龙江珍宝岛药业股份有限公司;批号:B20130115294、B20130115124、B20141109126);疏血通注射液(牡丹江友搏药业股份有限公司;批号:15032011、15032017);丹红注射液(山东丹红制药有限公司;批号:15041008、15091014、15091022);红花注射液(山西卫华药业有限公司;批号:14111111);血塞通注射液(云南白药集团股份有限公司;批号2BA1524);血塞通注射液(昆明制药集团股份有限公司;批号14FJ204-21);痰热清注射液(上海凯宝药业股份有限公司;批号:1502310、1507201、1506210)。

5-磺基水杨酸(国药集团化学试剂有限公司;批号:20130408);牛血清蛋白(美国 Sigma 公司,批号:0332);溶菌酶(Biodee 生物集团有限公司,编号:0663);SepHadex G-25(GE Healthcare 公司);聚山梨酯-80(南京威尔化工有限公司;批号:20130701);溶菌酶(美国 Sigma 公司,编号:L6876-1G);95%乙醇、85%磷酸、十二水合磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、硫酸钠均为分析纯,购于北京化工厂;本实验用水均为三重蒸馏水。

## 2 方法与结果

### 2.1 交联葡聚糖凝胶柱色谱分析法

**2.1.1 洗脱液的配制** 称取十二水合磷酸氢二钠 35.8 g,用三重蒸馏水定容至 1 000 mL 量瓶中。称取磷酸二氢钠 15.6 g,用三重蒸馏水定容至 1 000 mL 量瓶中。将 2 种溶液等比例混合即得洗脱液。

**2.1.2 供试品溶液的配制** 将溶胀好的 SepHadex G-25 加洗脱液配制成含 75% 凝胶的混悬液,沿色谱柱内壁缓慢匀速地将混悬液倒入色谱柱中,用 3~5 倍柱体积的洗脱液以  $3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  左右的速度平衡色谱柱,使其稳定。精确吸取 1.0 mL 的中药注射剂溶液进样,以  $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  的流速恒流洗脱;连接核

酸蛋白检测仪,记录色谱柱洗脱液在 280 nm 处的紫外吸收信号,色谱图见图 1。同时连接自动收集器,弃去前 5 mL 洗脱液,收集接下来的 20 mL 洗脱液,定容至 25 mL 量瓶中。该溶液即第二步凝胶高效液相色谱法的供试品溶液,进样前过  $0.45 \mu\text{m}$  微孔滤膜。

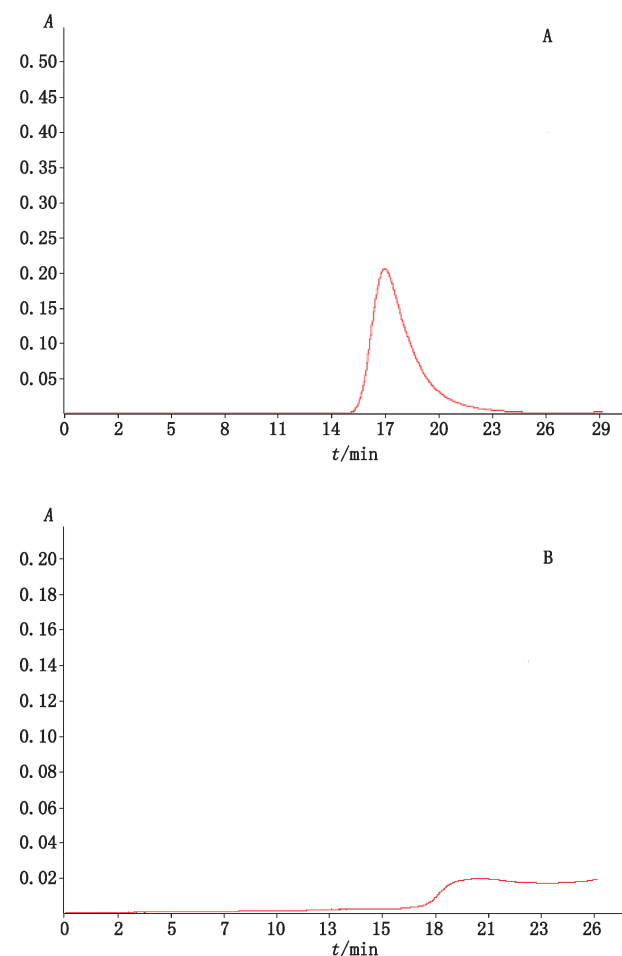


图 1  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  溶菌酶标准溶液(A)和舒血宁注射液(B20141109126)样品(B)色谱图

Fig. 1 The GCF chromatograms of  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  standard lysozyme solution(A) and Shuxuening injection(B20141109126)(B)

### 2.2 凝胶高效液相色谱法

**2.2.1 溶菌酶对照品溶液的配制** 精密称取溶菌酶对照品 5.0 mg,置 5 mL 棕色量瓶中,加三重蒸馏水溶解并稀释至刻度,摇匀,即得  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的溶菌酶对照品溶液。将该溶菌酶对照品溶液作为母液,根据实验需要,依次用洗脱液稀释至所需浓度,用前过  $0.45 \mu\text{m}$  微孔滤膜。

**2.2.2 溶菌酶对照品限量溶液的配制** 精密吸取 200  $\mu\text{L}$  溶菌酶对照品母液,置 250 mL 棕色量瓶中,



用洗脱液定容,摇匀,即得  $0.8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的溶菌酶对照品限量溶液,用前过  $0.45 \mu\text{m}$  微孔滤膜。该溶液的浓度作为本实验中中药注射液中大分子蛋白检查得限量浓度。

**2.2.3 色谱条件** 色谱柱:TSK-Gel G2000SWXL ( $7.8 \text{ mm} \times 300 \text{ mm}, 5 \mu\text{m}$ );流动相: $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  硫酸钠和  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  磷酸缓冲盐等体积混合液(pH6.7);流速: $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ;进样量  $100 \mu\text{L}$ ;检测波长:280 nm;柱温: $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 。色谱图见图 2。

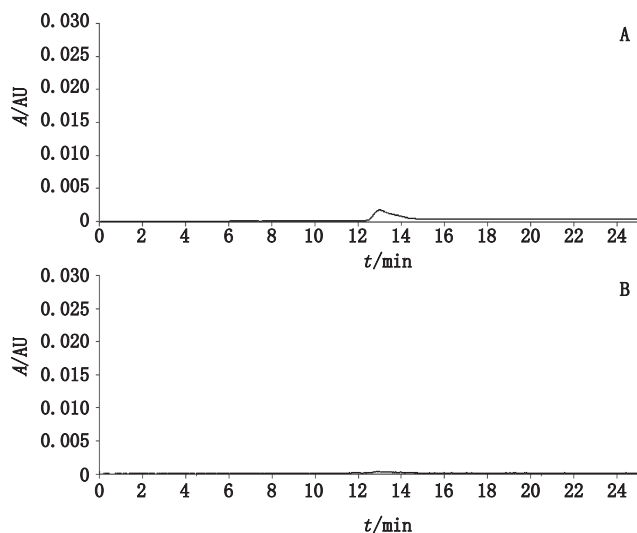


图 2  $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  溶菌酶对照品 (A) 和舒血宁注射液 (B20141109126) 样品 (B) 色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms of  $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  lysozyme reference substance (A) and Shuxuening injection (B20141109126) (B)

**2.2.4 溶菌酶对照品线性关系考察** 分别精密吸取  $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  和  $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的溶菌酶对照品溶液 5、10、20  $\mu\text{L}$ ,按“2.2.2”项下色谱条件进行测定。以溶菌酶对照品的进样量为横坐标,相应峰面积为纵坐标绘制标准曲线,得线性回归方程:

$$Y=1.765 \times 10^5 X - 4717.8 \quad R^2=0.9990$$

表明溶菌酶对照品在  $0.05 \sim 4 \mu\text{g}$  的范围内,进样质量与峰面积的线性关系良好。

**2.2.5 检测限和定量限** 精密吸取浓度为  $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  和  $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的溶菌酶对照品溶液各  $5 \mu\text{L}$ ,按“2.2.2”项下色谱条件进行检测。采用信噪比法确定溶菌酶标准蛋白的检测下限 ( $S/N \geq 3$ ) 和定量下限 ( $S/N \geq 10$ ) 分别为  $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  和  $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

**2.2.6 精密度试验** 精密称取浓度为  $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的溶菌酶对照品溶液  $10 \mu\text{L}$  以及  $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的溶菌酶对照品溶液  $5 \mu\text{L}$  和  $20 \mu\text{L}$ ,按“2.2.2”项下色谱

条件进行检测,上述 3 个进样浓度均连续进样测定 6 次,三者峰面积的 RSD 分别为 1.7%、1.4%、1.1%,表明仪器精密度良好。

**2.2.7 稳定性试验** 精密吸取浓度为  $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的溶菌酶对照品溶液  $10 \mu\text{L}$  以及  $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的溶菌酶对照品溶液  $5 \mu\text{L}$  和  $20 \mu\text{L}$ ,按“2.2.2”项下色谱条件进行检测。在 3 种进样量下,依次检测其在 0、2、4、6、12、24 h 时的峰面积和保留时间。由低到高 3 个进样浓度对应的峰面积 RSD 为 3.0%、2.3%、2.3%,三者保留时间的 RSD 分别为 1.1%、0.73%、0.50%,表明待测物质在 24 h 内稳定性良好。

**2.2.8 重复性试验** 分别精密吸取  $25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $250 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  和  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的溶菌酶对照品溶液  $100 \mu\text{L}$ ,按“2.2.2”项下色谱条件进行测定。由低到高 3 个浓度的色谱柱保留时间的 RSD 分别为 2.8%、1.7%、1.2%,三者 TSK 柱峰面积的 RSD 分别为 3.0%、2.3%、1.5%,表明两步凝胶法的重复性良好。

**2.2.9 回收率试验** 精密称取 3 组一定量溶菌酶对照品,一式 3 份,分别用洗脱液溶解配制成浓度为 20、40 和  $80 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的溶菌酶标准溶液,作为待测标准溶液。

将 3 种浓度的待测标准溶液按“2.1.2”项下方法制备相应供试品溶液,并按“2.2.2”项下色谱条件,进样  $100 \mu\text{L}$  进行检测。结果显示,3 种浓度下溶菌酶对照品的回收率分别为 83.4%、91.6%、91.7%;RSD 分别为 1.6%、2.3%、2.6%,平均回收率为 88.9%,表明两步凝胶法回收率良好。

**2.2.10 样品测定** 精密吸取中药注射液  $1 \text{ mL}$ ,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,并按“2.2.2”项下色谱条件进样  $100 \mu\text{L}$  进行检测。将样品峰面积与溶菌酶对照品限量溶液的峰面积 (19223) 进行比较,每个批次的中药注射剂样品均平行操作 2 次进行测定。样品图中未出现色谱峰或色谱峰的峰面积小于限量对照品溶液的峰面积,即认为该中药注射剂样品合格。本实验共检测了分属 8 个不同品种的 18 个批次的中药注射剂中的大分子蛋白,检测结果见表 1。

### 3 讨论

#### 3.1 两步凝胶法原理

本实验为实现中药注射剂中大分子蛋白精确、快速地检测,建立了两步凝胶法,其第一步采用交联葡聚糖凝胶色谱法来分离中药注射剂中的大分子蛋白组分,同时核酸蛋白检测仪对洗脱组分在 280 nm

**Tab. 1 The total peak area of impurity proteins in the sample solution**

样品 (sample)	批号 (batches)	总峰面积 (peak area) / (mAu·s) ( $t_R < 14.7$ min) <sup>a</sup>		检测结果 (detection result) <sup>b</sup>
		第一次检测	第二次检测	
		(the first detection)	(the second detection)	
双黄连 (Shuanghuanglian)	20120906	4545	4582	合格 (qualified)
	20130314	6263	5653	合格 (qualified)
天麻素 (Tianmasu)	12110939	14474	13234	合格 (qualified)
	12070815	8031	7575	合格 (qualified)
舒血宁 (Shuxuening)	B20130115294	9380	10392	合格 (qualified)
	B20130115124	8303	8913	合格 (qualified)
	B20141109126	7968	7522	合格 (qualified)
疏血通 (Shuxuetong)	15032011	8753	9546	合格 (qualified)
	15032017	7954	7521	合格 (qualified)
丹红 (Danhong)	15041008	13547	12498	合格 (qualified)
	15091014	12965	12530	合格 (qualified)
	15091022	9739	9657	合格 (qualified)
红花 (Honghua)	14111111	14421	14533	合格 (qualified)
血塞通 (Xuesaitong)	2BA1524	13259	13797	合格 (qualified)
	14FJ204-21	10921	10793	合格 (qualified)
痰热清 (Tanreqing)	1502310	6879	6632	合格 (qualified)
	1507201	6314	6421	合格 (qualified)
	1506210	6382	6087	合格 (qualified)

注 (note): a. 14.7 min 指溶菌酶对照品溶液在 TSK 色谱柱上完全出峰的时间 (the lysozyme was eluted completely from TSK column in 14.7 min); b. 中药注射剂检测结果合格与否的评判标准为峰面积是否小于限量对照品溶液的峰面积 (19223) [if the peak area of Chinese medicine injection was less than the standard (19223), the Chinese medicine injection is qualified]

处的吸收进行监测。中药注射剂中大分子蛋白质极有可能为中药注射剂中的致敏性物质,而部分中药注射剂中的有效成分为小分子多肽,为了排除小分子肽类成分的干扰,本实验以分子量为 14.3 KD 的溶菌酶出峰时间作为是否为大分子蛋白质的分界点,在第一步中通过收集分界点之前的洗脱液,保证所得洗脱组分中尽可能不含小分子物质。第二步采用凝胶高效液相色谱法,通过选择合适分离范围的凝胶色谱柱,对第一步所得洗脱液进行了某一分子量范围内的半定量分析,从而实现了中药注射剂中大分子蛋白质的准确检测。

### 3.2 蛋白质限量设定

磺基水杨酸比浊法为现行药典中检查中药注射剂中蛋白质的方法,文献报道<sup>[11]</sup>该方法的检测限为  $40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,然而  $20 \mu\text{g}$  蛋白质足以引发免疫反应(如,乙肝疫苗的成人一次免疫量为  $20 \mu\text{g}$ ),因此药典方法的检测限明显偏高<sup>[15]</sup>。本实验以限量对照品溶液的蛋白质含量作为中药注射剂的大分子蛋白质的检查限量。人为设定限量

对照品溶液的浓度为  $0.8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,在样品测定过程中,1 mL 中药注射液被稀释了 25 倍,即相当于中药注射液中大分子蛋白的限量值为  $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。因此本实验所建立的两步凝胶法具有更高的灵敏度。

### 3.3 样品检测结果分析

本实验同时采用中国药典磺基水杨酸比浊法对中药注射剂样品进行了检测,其结果表明 8 种中药注射剂中只有痰热清注射剂产生了浑浊反应。有文献报道,磺基水杨酸比浊法在检测痰热清注射液时,易产生假阳性现象,存在一定典型性<sup>[9]</sup>。本实验选取了市售 8 个不同品种共 18 个批次的中药注射剂进行检测,检测结果发现,不同中药注射剂品种中均能检出大分子蛋白的存在,虽含量略有差别,但均符合本实验设定的  $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的检查限量。不同种类中药注射剂中的大分子蛋白色谱峰的保留时间略有差异,但均与溶菌酶保留时间接近,表明市售中药注射剂中残留的大分子蛋白分子量范围接近,磺基水杨酸比浊法的实验结果同两步凝胶法的检测结果基本一致,也说明了本实验建立方法的可靠性。

#### 4 结论

目前中药注射剂中蛋白质的检查主要采用磺基水杨酸比浊法,但由于中药注射剂中成分比较复杂,可能会干扰该方法的准确性,使结果出现假阳性或假阴性情况。为了解决该问题,本实验建立了两步凝胶法限量检查中药注射剂中的大分子蛋白质。该方法整体上包括 2 个步骤,第一步利用交联葡聚糖凝胶柱实现注射剂中大分子蛋白质的分离,第二步利用凝胶高效液相色谱法检测大分子蛋白质的含量,并人为设定了  $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的大分子蛋白限量。本实验分别用磺基水杨酸比浊法和两步凝胶法检测了市售的 8 个不同品种 18 个批次的中药注射剂,2 种方法的检测结果基本一致。本实验建立的两步凝胶法检测限低,灵敏度较高,稳定性良好,检测结果可靠,可以用于中药注射剂中杂质蛋白的含量测定。本实验方法虽然相较于中国药典方法烦琐,但操作相对简单,专业性要求较低,检测耗时较短。本方法解决了中国药典方法的假阳性问题,为中药注射剂中大分子蛋白检查提供了更有效的方法,为进一步保证中药注射剂的药品质量和临床用药安全奠定了基础。

#### 参考文献

- [1] 亚莉,范庆国. 中药注射剂临床不良反应分析及合理用药建议[J]. 亚太传统医药, 2015, 11(2): 132  
YA L, FAN QG. Analysis of clinical adverse reactions of TCM injection and suggestions on rational use of drugs[J]. *Asia-Pacific Tradit Med*, 2015, 11(2): 132
- [2] 谭乐俊,王萌,朱彦,等. 中药注射剂的不良反应研究进展[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(20): 3889  
TAN LJ, WANG M, ZHU Y, *et al.* Research progress of adverse reactions of traditional Chinese medicine injections[J]. *China J Chin Mater*, 2014, 39(20): 3889
- [3] 谷丹华,张俐,李家春,等. 中药注射剂中大分子物质筛查方法研究[J]. 中国药学杂志, 2014, 49(1): 64  
GU DH, ZHANG L, LI JC, *et al.* Screening of macromolecules in traditional Chinese medicine injections[J]. *Chin Pharm J*, 2014, 49(1): 64
- [4] 刘汉清,靳洪涛,王爱平. 中药注射剂致敏物质研究进展[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2013, 27(3): 502  
LIU HQ, JIN HT, WANG AP. Research progress of sensitizing substances in traditional Chinese medicine injection[J]. *Chin J Pharmacol Toxicol*, 2013, 27(3): 502
- [5] 肖雪,付婵,梁琼麟,等. 中药注射剂中类蛋白质成分测定[J]. 中国药学杂志, 2012, 47(21): 1768  
XIAO X, FU C, LIANG QL, *et al.* Determination of protein components in traditional Chinese medicine injection[J]. *Chin Pharm J*, 2012, 47(21): 1768
- [6] 中国药典 2000 年版. 一部[S]. 2000: 60  
ChP 2000. Vol I [S]. 2000: 60
- [7] 中国药典 2015 年版. 一部[S]. 2015: 225  
ChP 2015. Vol I [S]. 2015: 225
- [8] 郭青,吴晓燕. 中药注射剂中蛋白质检查药典方法的假阳性原因探究[J]. 中国药品标准, 2011, 12(3): 219  
GUO Q, WU XY. Investigation on false positive results with pharmacopoeia method of the protein examination in Chinese medicinal injections[J]. *Drug Stand China*, 2011, 12(3): 219
- [9] 陈翔宇,孙胜斌,李响明,等. 冠心宁注射液蛋白质检查假阳性问题研究[J]. 中国现代中药, 2015, 17(11): 1212  
CHEN XY, SUN SB, LI XM, *et al.* Study on false positive results with protein examination in Guanxinning injection[J]. *Mod Chin Med*, 2015, 17(11): 1212
- [10] 陈丹丹,张甦,于泓,等. 痰热清注射液中微量蛋白检测方法的改进[J]. 中成药, 2014, 36(7): 1470  
CHEN DD, ZHANG S, YU H, *et al.* Improvement in detection of trace protein in Tanreqing injection[J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2014, 36(7): 1470
- [11] 祖金玥,冯孟鑫,王小红,等. 聚山梨酯 80 对药典方法检查中药注射剂蛋白的影响[J]. 中国药品标准, 2015, 16(1): 36  
ZU JY, FENG MX, WANG XH, *et al.* Influence of polysorbate 80 on examining protein in Chinese medicinal injections with pharmacopoeia method[J]. *Drug Stand China*, 2015, 16(1): 36
- [12] 段为钢,柯瑾,李奇峰,等. 蛋白质包被 PVDF 膜吸附法检查中药注射剂缩合鞣质[J]. 中成药, 2011, 33(11): 1916  
DUAN WG, KE J, LI QF, *et al.* Detection of condensed tannin in herb injections by the use of protein coated PVDF membrane[J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2011, 33(11): 1916
- [13] 王雪,张伟,李家春,等. 4 种常用蛋白质测定方法用于中药注射剂中大分子蛋白检测的适用性研究[J]. 中草药, 2015, 46(15): 2228  
WANG X, ZHANG W, LI JC, *et al.* Determination of macromolecule protein in Chinese materia medica injection[J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2015, 46(15): 2228
- [14] 任娇艳,卢韵君,廖文镇,等. 凝胶色谱测定核桃肽分子量方法比较[J]. 现代食品科技, 2015, 189(5): 267  
REN JY, LU YJ, LIAO WZ, *et al.* Molecular comparison of gel-permeation chromatography methods to determine the weight of walnut peptides[J]. *Mod Food Sci Technol*, 2015, 189(5): 267
- [15] 段为钢,李奇峰,柯瑾. 滤过吸附法检查中药注射剂微量蛋白质[C]//环境污染与公共卫生会议论文集. 武汉: 科研出版社, 2011: 45  
DUAN WG, LI QF, KE J. Detection of Trace Protein in Chinese Materia Medica Injections by Use of Polyvinylidene Fluoride Membrane [C]//Proceedings of Conference on Environmental Pollution and Public Health. Wuhan: Scientific Research Publishing, 2011: 45

(本文于 2017 年 3 月 24 日收到)