

3603 氢氧化铝胶质量标准（标准草案）

用于制造兽用生物制品的氢氧化铝胶（简称铝胶），应符合以下标准。

1 性状

乳白色或淡灰白色、细腻无臭的胶体，薄层半透明，静置能析出少量水分，不得含有异物。

2 无菌检验

按附录 3306 进行检验，应无菌生长。

3 pH 值测定

将灭菌后的氢氧化铝胶，用新煮沸冷却后的注射用水稀释至 5 倍，按附录 3101 方法进行测定，pH 值应为 6.0~7.2。

4 氯化物含量测定

按氯化物检查法（《中国兽药典》一部附录）进行测定，应不超过 0.3%。

5 硫酸盐含量测定

按硫酸盐检查法（《中国兽药典》一部附录）进行测定，应不超过 0.4%。

6 氨含量测定

按铵盐检查法（《中国兽药典》一部附录）进行测定，应不超过万分之一。

7 重金属含量测定

按重金属检查法（《中国兽药典》一部附录）进行测定，应不超过百万分之五。

8 砷盐含量测定

按砷盐检查法（《中国兽药典》一部附录）进行，应不超过千万分之八。

9 氧化铝含量测定

取待检品适量（含铝不超过 12mmol），精密称定（ m ），加盐酸与水各 10ml，煮沸溶解后，放冷，全部转移至 250ml 容量瓶中，用水稀释至刻度，摇匀；精密量取 25ml（ V_2 ），加氨试液中和至恰析出沉淀，再滴加稀盐酸至沉淀恰溶解为止，加醋酸-醋酸铵缓冲液（pH 值 6.0）10ml。再精密加乙二胺四醋酸二钠滴定液（0.05mol/L）25ml（每 1ml 乙二胺四醋酸二钠滴定液（0.05mol/L）可结合 3.900mg 的 $Al(OH)_3$ ）。煮沸 3~5 分钟，放冷，加二甲酚橙指示液 1ml，用经标定的锌滴定液（0.05mol/L）（ c ）滴定至溶液自黄色转变为红色获得 V_1 ，并将滴定的结果用空白试验（以水代替）校正获得 V_0 。按氧化铝含量计，应不超过 3.9%。

氧化铝含量计算公式如下：

$$\text{氧化铝含量 (\%)} = \frac{(V_0 - V_1) \times c \times 509.8}{m} \times 100\%$$

式中： V_0 ：空白实验消耗锌滴定液的体积（ml）

V_1 ：供试品所消耗的锌滴定液的体积（ml）

m ：待检品重量（mg）

c ：锌滴定液浓度（mol/L）

10 吸附率测定

样品制备 取供试品适量，用 0.85%~0.90%氯化钠溶液稀释至铝含量为 1mg/ml，调节 pH 值至 6.0~7.0，即为样品溶液。同一种铝佐剂不同批次的 pH 值应调节为固定值，以保证不同批次检测的批间一致性。

牛血清白蛋白（简称 BSA）溶液 取 BSA 适量，用 0.85%~0.90%氯化钠溶液配制成 10mg/ml 溶液，调节 pH 值与样品溶液 pH 值一致。

测定法 取 15m 离心管 5 支，分别加 BSA 溶液（10mg/ml）0.08ml、0.16ml、0.4ml、0.8ml、1.2ml，并补 0.85%~0.90%氯化钠溶液至 4.0ml，混匀后，每管分别加入样品溶液 1.0ml，混匀，使各管 BSA 分别为 0.8mg、1.6mg、4mg、8mg、12mg，各管含铝为 1mg。

将上述各管室温放置 1 小时（期间每隔 10 分钟用力振摇 1 次）后，以 5000g 离心 10 分钟，收集上清液，采用福林酚法（Lowry 法）或 2,2'-联喹啉-4,4'-二羧酸法（BCA 法）或其他适宜方法测定各管上清液中游离 BSA 含量，记录各管吸光度值并计算蛋白质含量，以各管上清液游离的 BSA 含量对应其 BSA 总量计算各管吸附率。上清液体积按 5ml 计算。

$$\text{吸附率}(\%) = \left(\frac{\text{牛血清白蛋白总量} - \text{上清游离蛋白含量}}{\text{牛血清白蛋白总量}} \right) * 100$$

结果判定 BSA 含量为 0.8mg、1.6mg 的 2 管上清蛋白质应为未检出或吸附率应不低于 90%；且 BSA 含量为 4mg、8mg、12mg 各管吸光度值应呈总体递增趋势（如吸光度值无法判定，需通过检测上清蛋白质含量判定其总体递增趋势），吸附率判为合格。

如供试品铝含量低于 1mg/ml，可按适当比例调整上述各管铝含量和 BSA 含量后进行。结果判定以每 1mg 铝吸附 1.6mg BSA 的吸附率应不低于 90%或上清蛋白质未检出，且每 1mg 铝与更高浓度 BSA 吸附时，随 BSA 含量的递增各管吸光度值应呈总体递增趋势（如吸光度值无法判定，需通过检测上清蛋白质含量判定其呈总体递增趋势），吸附率判为合格。

附注：

1 氢氧化铝胶中的铝含量计算：

举例：若根据氧化铝含量为 1.9%，计算出铝含量为 10 mg/ml。

计算方法：1.9%氧化铝含量理论是指 100g（约为 100ml）产品含 Al₂O₃ 有 1.9g。

1.9/102=Al₂O₃ 的摩尔量=0.0186mol

0.0186*54=铝元素的重量=1.006g

1.006*1000/100=铝的含量浓度 mg/ml=10.06mg/ml，即铝含量约为 10mg/ml。

2 福林酚法（Lowry 法）

本法系依据蛋白质分子中含有的肽键在碱性溶液中与 Cu²⁺螯合形成蛋白质-铜复合物，此复合物使酚试剂的磷钨酸还原，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呈正比，以蛋白质对照品溶液作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 20~250μg。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。

除另有规定外，按方法 1 操作；如有干扰物质时，除另有规定外，按方法 2 操作并需经方法学验证。

方法 1

试剂 碱性铜试液 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。

对照品溶液的制备 除另有规定外,取血清白蛋白(牛)对照品或蛋白质含量测定国家标准品,加水溶解并制成每 1ml 中含 0.2mg 的溶液。

供试品溶液的制备 照各品种项下规定的方法制备(蛋白质浓度应与对照品溶液基本一致)。

测定法 精密量取对照品溶液 0.0ml、0.2ml、0.4ml、0.6ml、0.8ml、1.0ml (对照品溶液取用量可在本法测定范围内进行适当调整),分别置具塞试管中,各加水至 1.0ml,再分别加入碱性铜试液 1.0ml,摇匀,室温放置 10 分钟,各加入福林酚试液[取福林试液中的贮备液(2mol/L 酸浓度) 1→16]4.0ml,立即混匀,室温放置 30 分钟,照紫外-可见分光光度法,在 650nm 的波长处测定吸光度;同时以 0 号管作为空白。以对照品溶液浓度与其相对应的吸光度计算线性回归方程。另精密量取供试品溶液适量,同法测定。从线性回归方程计算供试品溶液中的蛋白质浓度,并乘以稀释倍数,即得。

方法 2

测定前将脱氧胆酸盐-三氯醋酸加入样品中,通过将蛋白质沉淀来去除干扰物质。这种方法也可用于将稀溶液中的蛋白质浓集。

试剂 试液 A 取 1%氢氧化钠溶液 200ml 与 5%碳酸钠溶液 200ml 混合,加水稀释至 500ml。

试液 B 取 2.98%二水合酒石酸二钠溶液 100ml 与 1.25%硫酸铜溶液 100ml 混合,加水稀释至 250ml,临用新制。

试液 C 取试液 A 与试液 B 按 50:1 的比例混合,临用新制。

福林酚试液 取福林试液中的贮备液(2mol/L 酸浓度) 1→2 (所配得的福林酚试液应满足以下要求:取供试品溶液 1ml,加试液 C 5ml 和配好的福林酚试液 0.5ml,所得溶液的 pH 值应为 10.3±0.3。若溶液 pH 值超出范围,应适当调整福林酚试液的稀释倍数)。

去氢胆酸钠试液 取去氢胆酸钠适量,加水制成每 1ml 中含 1.5mg 的溶液。

对照品溶液的制备 除另有规定外,取血清白蛋白(牛)对照品或蛋白质含量测定国家标准品适量,加水分别制成每 1ml 中含 0.00mg、0.01mg、0.02mg、0.03mg、0.04mg、0.05mg 的溶液(对照品溶液浓度可在本法测定范围内进行适当调整)。

测定法 精密量取各对照品溶液 1.0ml,分别置玻璃试管中,加入去氧胆酸钠试液 0.1ml,涡旋混匀,室温放置 10 分钟,加入 72%三氯醋酸溶液 0.1ml,涡旋混匀,在 3000g 条件下离心 30 分钟,轻轻倒出上清液,用吸管将剩余液体移除。蛋白质沉淀用试液 C 1ml 复溶后,再加入试液 C 5ml,混匀,室温放置 10 分钟,加入福林酚试液 0.5ml,立即混匀,室温放置 30 分钟,照紫外-可见分光光度法,在 750nm 的波长处测定吸光度;同时以 0 号管作为空白。以对照品溶液浓度与其相对应的吸光度计算线性回归方程。另精密量取供试品溶液 1.0ml,同法测定。从线性回归方程计算供试品溶液中的蛋白质浓度并乘以稀释倍数,即得。

3 2,2'-联喹啉-4,4'-二羧酸法(BCA 法)

本法系依据蛋白质分子在碱性溶液中将 Cu^{2+} 还原为 Cu^+ , 2,2'-联喹啉-4,4'-二羧酸(BCA)与 Cu^+ 结合形成紫色复合物,在一定范围内其颜色深浅与蛋白质浓度呈正比,以蛋白质对照品溶液作标准曲线,采用比色法测定供试品中蛋白质的含量。

本法灵敏度较高,测定范围可达 80~400 μg 。本法测定的供试品中不能有还原剂和铜螯合物,否则干扰测定。

试剂 铜-BCA 试液 取 2,2'-联喹啉-4,4'-二羧酸钠 1g,无水碳酸钠 2g,酒石酸钠 0.16g,氢氧化钠 0.4g 与碳酸氢钠 0.95g,加水使溶解成 100ml,调节 pH 值至 11.25,作为甲液;另取 4%硫酸铜溶液作为乙液。临用前取甲液 100ml,加入乙液 2ml,混匀,即得。

对照品溶液的制备 除另有规定外,取血清白蛋白(牛)对照品或蛋白质含量测定国家标准品,加水溶解并制成每 1ml 中含 0.8mg 的溶液。

供试品溶液的制备 照各品种项下规定的方法制备(蛋白质浓度应与对照品溶液基本一致)。

测定法 精密量取对照品溶液 0.0ml、0.1ml、0.2ml、0.3ml、0.4ml、0.5ml (对照品溶液取用量可在本法测定范围内进行适当调整),分别置具塞试管中各加水至 0.5ml,再分别加入铜-BCA 试液 10.0ml,立即混匀,置 37°C 水浴中保温 30 分钟,放冷,照紫外-可见分光光度法,立即在 562nm 的波长处测定吸光度;同时以 0 号管作为空白。以对照品溶液浓度与其相对应的吸光度计算线性回归方程。另精密量取供试品溶液适量,同法测定。从线性回归方程计算供试品溶液中的蛋白质浓度,并乘以稀释倍数,即得。

此法亦可采用商品化试剂盒。

修订说明:

1. 本标准是在 2020 年版《中国兽药典》三部附录 3603 的基础上修订而成。

2. 将“吸附力”改为“吸附率”,并对于检验顺序进行了调整,将吸附率项调整到最后。细化了吸附率测定的方法。

3. 取消原增加内毒素检测的提议。

(1)《氢氧化铝胶质量标准》修订草案(01 版本)建议增加内毒素检测标准的背景:

现有氢氧化铝胶佐剂质量标准无内毒素检测标准规定,但氢氧化铝胶佐剂本身具备吸附内毒素能力的特性,且其最终会与抗原配伍,共同注射入动物机体内,为确保其在动物体内的安全应用,《欧洲药典》10.0 以及《中国药典》2020 年版中均设置了内毒素检测标准(表 1)。基于上述事实,在 01 版本草案中建议增加内毒素检测标准,具体为按照《中华人民共和国兽药典》2020 年版一部附录 1143 细菌内毒素检查法进行检测,每 1mg 铝含细菌内毒素应 $<5\text{EU}$ 。

表 1 各个国家或组织的内毒素检测实施情况

药典	内毒素控制	内容
欧洲药典 10.0	有	每 1mg 铝 $<5\text{EU}$
中国药典 2020 年版	有	每 1mg 铝 $<5\text{EU}$
韩国药典	无	微生物限度
印度药典	无	微生物限度
美国药典	无	微生物限度
日本药典	无	无
国际药典	无	无

(2)取消增加内毒素检测标准建议的依据 通过进一步了解现有内毒素检测方法以及不同氢氧化铝胶佐剂产品特性,发现现有方法不能完全适用于所有产品特性,具体理由如下:

现行版《中国兽药典》一部附录 1143 内毒素检查法为凝胶法和光度测定法,两种方法的原理均为内毒素与鲎试剂产生凝集反应,产生一定的浊度,通过目测或设备的吸光度或透光率与反应的量化关系来确认内毒素的含量。对于有浊度无吸附性的样品,可以通过离心处理后检测上清样品;对于有浊度且有吸附性的样品,可以解离吸附后离心取上清检测;但是对于有浊度,且不易解离的样品,内毒素反应检测将会受到较大限制,甚至无法检测。现有氢氧化铝胶佐剂产品剂型复杂,但大部分均有一定的浊度,且吸附性强,难以解离。可见现有内毒素检测方法的局限性存在不能客观反映各类型氢氧化铝胶产品特性的可能性,考虑

《中国兽药典》的权威性和严肃性，建议暂不将氢氧化铝胶内毒素检测标准纳入 2025 年版《中国兽药典》。故此删除了内毒素含量测定项。

4. 增加了附注。氢氧化铝胶中的铝含量计算方法、福林酚法（Lowry 法）和 2,2'-联喹啉-4,4'-二羧酸法（BCA 法）。

5. 依据 2024 年第 5 次会议审查意见，保留性状项中“不得含有异物，”的规定。

6. 依据 2024 年第 13 次会议审查意见，增加了无菌检验项。