

## 小牛脾提取物注射液

Xiaoniupi Tiquwu Zhusheyeye

Calf Spleen Extractive Injection

本品为小牛脾提取物溶液的无菌水溶液。含多肽应为标示量的 90.0%~110.0%，含寡核苷酸以 D-核糖计算应为标示量的 80.0%~120.0%。

**【性状】** 本品为淡黄色澄明液体。

**【鉴别】** (1) 取本品 2ml，加双缩脲试液（取硫酸铜 1.5g 和酒石酸钾钠 6.0g，加水 500ml 使溶解，边搅拌边加入 10%氢氧化钠溶液 300ml，用水稀释至 1000ml，摇匀）4ml，摇匀，放置 15 分钟，溶液应显蓝紫色至紫红色。

(2) 照高效液相色谱法（中国药典 2020 年版四部通则 0512）测定。

供试品溶液 取本品作为供试品溶液。

对照品溶液 取小牛脾提取物对照溶液作为对照品溶液。

系统适用性溶液 取色氨酸适量，加水溶解并稀释制成每 1ml 中约含 0.1mg 的溶液。

色谱条件 用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂（4.6mm×250mm，5 $\mu$ m 或效能相当的色谱柱）；以磷酸盐溶液（取磷酸 1.0ml，三乙胺 0.5ml，加水 500ml）为流动相 A，磷酸-乙腈（1:1000）为流动相 B，按下表进行梯度洗脱；流速为每分钟 1.0ml；检测波长 280nm；柱温 30 $^{\circ}$ C；进样体积 5 $\mu$ l。

时间（分钟）	流动相 A（%）	流动相 B（%）
0	100	0
10	100	0
30	90	10
40	50	50
43	10	90
45	10	90

系统适用性要求 系统适用性溶液连续进样 5 次，主峰保留时间和峰面积的相对标准偏差分别不得过 1.0%和 2.0%；理论板数按色氨酸峰计算应不低于 50000。

测定法 取供试品溶液与对照品溶液，分别注入液相色谱仪，记录色谱图。

限度 按中药色谱指纹图谱相似度评价系统计算，供试品溶液色谱图与对照品溶液色谱图的相似度（扣除色氨酸峰后）不得低于 0.90。

**【检查】pH 值** 应为 5.0~7.0（中国药典 2020 年版四部通则 0631）。

**蛋白质** 取本品 2ml，加 20%碘基水杨酸溶液 2ml，摇匀，不得发生混浊。

**高分子量物质** 照高效液相色谱法（中国药典 2020 年版四部通则 0512）测定。

供试品溶液 取本品，用流动相稀释制成每 1ml 中约含多肽 1mg 的溶液。

对照品溶液 取人胰岛素对照品（分子量 5808）适量，加流动相溶解并定量稀释制成每 1ml 中约含 1mg 的溶液。

**系统适用性溶液** 取核糖核酸酶 A（分子量 13700）、胰岛素（分子量 5808）、胸腺肽 a1（分子量 3108）、生长抑素（分子量 1638）对照品各适量，加流动相溶解并定量稀释制成每 1ml 中约含 1mg 的混合溶液。

**灵敏度溶液** 精密量取对照品溶液适量，用流动相定量稀释制成每 1ml 中约含 1 $\mu$ g 的溶液。

**色谱条件** 用凝胶色谱柱（TSK GEL 2000SWxl 7.8mm $\times$ 300mm，5 $\mu$ m 或效能相当的色谱柱）；以三氟乙酸-乙腈-水（0.05：40：60）为流动相；流速为每分钟 0.7ml；检测波长为 214nm；进样体积 20 $\mu$ l。

**系统适用性要求** 系统适用性溶液色谱图中，连续进样 3 次，各峰保留时间的相对标准偏差不得大于 2.0%；各相邻峰之间的分离度按峰高与峰谷之比计算均不得小于 2.0；以各峰的保留时间为横坐标，分子量对数为纵坐标进行线性回归，相关系数不得小于 0.99。对照品溶液色谱图中，理论板数按胰岛素峰计应不低于 3000。灵敏度溶液色谱图中，人胰岛素峰高的信噪比应不小于 10。

**测定法** 取供试品溶液与对照品溶液，分别注入液相色谱仪，记录色谱图，按面积归一化法计算（注：数据处理时，应在对照品主峰保留时间处对供试品溶液色谱图中的峰进行垂直分割处理。）。

**限度** 供试品溶液色谱图中小于人胰岛素峰保留时间的各峰面积之和不得过 4.0%。小于灵敏度溶液主峰面积的色谱峰忽略不计。

**吸收度** 取本品，用水稀释制成每 1ml 中约含多肽 20 $\mu$ g 的溶液，照紫外-可见分光光度法（中国药典 2020 年版四部通则 0401）测定，在 260nm 与 280nm 波长处吸收度的比值应为 1.50~1.75。

**氨基酸** 用适宜的氨基酸分析仪或高效液相色谱仪进行分离测定。

**供试品溶液** 精密量取本品适量，用水定量稀释至适宜浓度，作为游离氨基酸供试品溶液。精密量取游离氨基酸供试品溶液适量，置玻璃水解管中，加等量浓盐酸，摇匀，将水解瓶充氮气，封口，于 110 $^{\circ}$ C 水解 20 小时。取出，放冷，启封，水浴蒸干或氮气吹干，残渣加水溶解并定量稀释至适宜浓度，作为总氨基酸供试品溶液。

**对照品溶液** 取 16 种氨基酸（门冬氨酸、谷氨酸、丝氨酸、甘氨酸、组氨酸、精氨酸、苏氨酸、丙氨酸、脯氨酸、酪氨酸、缬氨酸、甲硫氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、盐酸赖氨酸）对照品各适量，精密称定，加 0.1mol/L 盐酸溶液溶解并定量稀释制成适宜浓度的溶液。

**系统适用性要求** 对照品溶液色谱图中，各氨基酸峰之间的分离度均应不小于 1.0。

**测定法** 用适宜的氨基酸分析仪或高效液相色谱仪（建议方法见附 1，也可采用其他适宜的方法进行分离）分别测定游离氨基酸和总氨基酸含量。

**限度** 每 1ml 中含游离氨基酸应为 3.0~6.0mg，每 1ml 中总氨基酸与游离氨基酸之差不得少于 1.0mg。

**渗透压摩尔浓度** 取本品，依法测定（中国药典 2020 年版四部通则 0632），渗透压摩尔浓度应为 230~350mOsmol/kg。

**生物活性** 取本品适量，照 T 细胞活性测定法-脱 E 受体法（附 2）测定，供试品测定管

E 玫瑰花结百分率与脱 E 受体胸腺 T 细胞对照管 E 玫瑰花结百分率之差不得低于 10.0%。

**异常毒性** 取本品，依法检查（中国药典 2020 年版四部通则 1141），按静脉注射法给药，应符合规定。

**过敏试验** 取本品，依法检查（中国药典 2020 年版四部通则 1147），应符合规定。

**细菌内毒素** 取本品，依法检查（中国药典 2020 年版四部通则 1143），每 1mg 多肽中含内毒素的量应小于 0.8EU。

**降压物质** 取本品，用氯化钠注射液定量稀释制成每 1ml 中约含多肽 0.5mg 的溶液，依法检查（中国药典 2020 年版四部通则 1145），剂量按猫体重每 1kg 注射 0.2ml，应符合规定。

**其他** 应符合注射剂项下有关的各项规定（中国药典 2020 年版四部通则 0102）。

**【含量测定】多肽** 取本品适量，用水定量稀释制成每 1ml 中约含多肽 0.1mg 的溶液，作为供试品溶液，精密量取 1ml，照蛋白质含量测定法（中国药典 2020 年版四部通则 0731 第二法方法 1）测定，对照品为血清白蛋白（牛）。

**核糖** 照紫外-可见分光光度法（中国药典 2020 年版四部通则 0401）测定。

**供试品溶液** 取本品适量，用 5%三氯醋酸溶液定量稀释制成每 1ml 中约含核糖 5 $\mu$ g 的溶液。

**对照品溶液** 精密称取 D-核糖对照品适量，加 5%三氯醋酸溶液溶解并定量稀释制成每 1ml 中约含 20 $\mu$ g 的溶液。

**测定法** 精密量取对照品溶液 0.0ml、0.2ml、0.4ml、0.6ml、0.8ml、1.0ml 分别置具塞试管中，分别加入 5%三氯醋酸溶液适量至 2.0ml，各加入 3, 5-二羟基甲苯溶液[取 3, 5-二羟基甲苯 1g，溶于 0.1%三氯化铁-盐酸溶液（取三氯化铁 0.5g，加浓盐酸溶解使成 500ml，可长期使用）100ml 中，临用新配] 2.0ml，摇匀，置水浴中准确加热 30 分钟，迅速冷却至室温，在 650nm 的波长处测定吸光度；以 0 号管作为空白。以浓度为横坐标，吸光度为纵坐标计算线性回归方程。另精密量取供试品溶液 2ml 置具塞试管中，自“各加入 3, 5-二羟基甲苯溶液 2.0ml”起，同法测定。从线性回归方程计算供试品溶液中的核糖含量。

**【类别】** 免疫调节药。

**【规格】** 2ml：5mg 多肽：380 $\mu$ g 核糖

**【贮藏】** 密闭，在凉暗处保存。

## 附 1

### 高效液相色谱仪测定氨基酸——异硫氰酸苯酯柱前衍生法

氨基酸 照高效液相色谱法（中国药典 2020 年版通则 0512）测定。

内标溶液 取正亮氨酸适量，加 0.1mol/L 盐酸溶液溶解并稀释制成每 1ml 中约含 1mg 的溶液，摇匀。

1mol/L 三乙胺乙腈溶液 取三乙胺 1ml，加乙腈 6.2ml，摇匀。

0.1mol/L 异硫氰酸苯酯乙腈溶液 取异硫氰酸苯酯 0.1ml，加乙腈 8.2ml，摇匀。

游离氨基酸测定用供试品溶液 精密量取本品 2.5ml 置 10ml 量瓶中，精密加入内标溶液 2ml，用 0.1mol/L 盐酸溶液稀释至刻度，摇匀。

总氨基酸测定用供试品溶液 精密量取游离氨基酸供试品溶液 1.0ml，置玻璃水解管中，加浓盐酸（含 0.2% 苯酚）1.0ml，摇匀，将水解瓶充满氮气，熔封，于 110℃ 水解 24 小时。取出，放冷至室温，启封，水浴蒸干，残渣加 0.1mol/L 盐酸溶液 1.0ml 溶解，即得。

氨基酸对照品溶液 取以下氨基酸对照品适量（门冬氨酸 17mg、谷氨酸 30mg、丝氨酸 12mg、甘氨酸 14mg、组氨酸 5mg、精氨酸 14mg、苏氨酸 9mg、丙氨酸 18mg、脯氨酸 11mg、酪氨酸 6mg、缬氨酸 21mg、蛋氨酸 5mg、异亮氨酸 8mg、亮氨酸 25mg、苯丙氨酸 12mg、盐酸赖氨酸 27mg），精密称定，置同一 100ml 量瓶中，精密加入内标溶液 20ml，用 0.1mol/L 盐酸溶液溶解并稀释至刻度，摇匀。

色谱条件 用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂（Phenomenex Synergi Hydro-RP 柱，4.6mm×250mm，5μm 或其他适宜的色谱柱）；以 0.1mol/L 醋酸钠溶液（用冰醋酸调节 pH 值至 6.5）—乙腈（97：3）为流动相 A，以乙腈—水（4：1）为流动相 B，流速为每分钟 1.0ml；柱温 40℃；检测波长 254nm；进样体积 2μl。按下表进行梯度洗脱。对照品溶液色谱图中，各氨基酸峰之间的分离度均应不小于 1.0。

时间/分	流动相 A	流动相 B
0.01	100	0
2	96	4
2.1	94	6
8	93	7
9	80	20
17	79	21
20	70	30
24	0	100
26	0	100
26.1	100	0
30	100	0

测定 分别精密量取供试品溶液与对照品溶液各 600μl 置离心管中，精密加入 1mol/L 三乙胺乙腈溶液 300 μl，摇匀，再精密加 0.1mol/L 异硫氰酸苯酯乙腈溶液 300μl，摇匀，放置 1 小时，精密加入 2.4ml 正己烷，剧烈振摇，放置 10 分钟，取下层液，用 0.45μm 滤膜过滤，分别注入液相色谱仪，记录色谱图。按内标法以峰面积计算。

## 附 2

### T 细胞活性测定法——脱 E 受体法

本法系根据小牛脾提取物可使脱 E 受体后的胸腺 T 细胞恢复其 E 受体功能，从而反映小牛脾提取物的生物活性

#### 试剂 (1) Hank's 液

(2) 阿氏液 取氯化钠 0.420g, 枸橼酸 0.055g, 枸橼酸钠 0.766g, 葡萄糖 2.05g, 加水溶解并稀释至 100ml, 灭菌。

(3) 分离液 淋巴细胞分离液。

(4) 羊血 取绵羊静脉血 5ml, 加入至阿氏液 5ml 中, 冰箱保存。

(5) 固定液 取 25%戊二醛溶液、3.5%碳酸氢钠溶液与 Hank's 液依次按 1: 1: 38 比例混合。

(6) 姬姆萨染色液原液 取姬姆萨染料 0.5g, 加甘油 33ml, 55~60°C 加热至姬姆萨染料溶解, 冷至室温, 加甲醇 33ml, 放置 24 小时后, 用滤纸过滤, 滤液即为原液。密封室温保存。

(7) 染色液取姬姆萨染色液原液 2ml, 加 Hank's 液 6ml, 摇匀, 以每分钟 1500 转离心 10 分钟, 取上清液备用。

操作法 (1) 胸腺 T 细胞悬液与脱 E 受体胸腺 T 细胞悬液 取新鲜猪胸腺, 去除脂肪并剪碎, 加 Hank's 液适量使成细胞悬液, 经 100 目筛过滤, 每分钟 1500 转离心 3~5 分钟, 弃去上清液, 加入少量 Hank's 液打匀, 将此溶液加入已具有 1/3 滤液量的分离液的离心管中, 以每分钟 2000 转离心 20 分钟, 小心吸出中间层的胸腺细胞, 放入另一离心管中, 加 Hank's 液适量洗涤, 摇匀, 以每分钟 1500 转离心 3~5 分钟, 弃去上清液, 洗涤一次后, 在沉淀物中加入 Hank's 液适量, 摇匀, 分成两份, 一份在 45°C 恒温水浴保温 30 分钟 (每隔 5 分钟振摇一次), 以每分钟 1500 转离心 3~5 分钟, 弃去上清液, 再加入 Hank's 液适量, 摇匀后, 置 45°C 恒温水浴保温 30 分钟, 取出后以每分钟 1500 转离心 3~5 分钟, 弃去上清液。用 Hank's 液洗涤三次 (操作同前), 再用 Hank's 液适当稀释并计数, 使最终浓度为每 1ml 中  $(3 \times 10^6) \sim (5 \times 10^6)$  个细胞, 作为脱 E 受体胸腺 T 细胞悬液。另一份用 Hank's 液洗涤三次 (操作同前), 用 Hank's 液适当稀释并计数, 使终浓度为每 1ml 中  $(3 \times 10^6) \sim (5 \times 10^6)$  个细胞, 作为胸腺 T 细胞悬液。

(2) 绵羊红血球悬液 取适量羊血, 用适量 Hank's 液洗三次 (操作同前)。弃去上清液, 加适量 Hank's 液稀释并计数, 使终浓度为脱 E 受体胸腺 T 细胞悬液浓度的 8~10 倍。

(3) 供试品溶液 取供试品适量, 用 Hank's 液配制成每 1ml 中约含 1mg 多肽的溶液。

(4) 测定法 取小试管 9 支, 其中 6 支各加 Hank's 液 0.1ml 作为对照管, 另 3 支各加供试品溶液 0.1ml 作为测定管, 对照管中 3 支加胸腺 T 细胞悬液 0.2ml, 3 支加脱 E 受体胸腺 T 细胞悬液 0.2ml, 测定管中各加脱 E 受体胸腺 T 细胞悬液 0.2ml, 37°C 保温 1 小时后, 加入绵羊红血球悬液 0.2ml, 摇匀, 以每分钟 500~1000 转离心 3 分钟, 放入 4°C 冰箱过夜, 次日取出, 弃去上清液, 每管中各加入固定液一滴, 轻轻摇匀, 静置 10 分钟, 加入染色液 2 滴并摇匀, 静置 15 分钟后开始计数, 显微镜视野中淡蓝色的较大的细胞为淋巴细胞, 共数计数板 64 个大方格上所有淋巴细胞的个数 (不少于 200 个), 统计其中的 E 玫瑰

花结形成的细胞数（结合 3 个以上绵羊红细胞的淋巴细胞），求得 E 玫瑰花结百分率，取平均值，即为供试品管或对照管的平均值。胸腺 T 细胞对照管的 E 玫瑰花结率平均值应不低于 55%，并且与脱 E 受体胸腺 T 细胞对照管的 E 玫瑰花结率平均值的差应不低于 20%，否则测定结果无效，应重取猪胸腺再测。

活力 = 供试品测定管 E 玫瑰花结百分率 - 脱 E 受体胸腺 T 细胞对照管 E 玫瑰花结百分率

### 附 3

#### 小牛脾提取物溶液

#### Xiaoniupi Tiquwu Rongye

#### Calf Spleen Extractive Solution

本品系用健康乳牛（出生 24 小时内）脾脏为原料，经去脂肪、匀浆、冻融、加热提取、超滤等制成含多肽和寡核苷酸的溶液。每 1ml 中含多肽不得少于 3.0mg，含寡核苷酸以 D-核糖计算不得少于 200 $\mu$ g。

**【制法】**本品应从符合附 4 要求的健康乳牛（出生 24 小时内）脾脏中提取，生产工艺（附 5）应符合现行版《药品生产质量管理规范》要求，生产工艺中应采用适宜的病毒灭活（去除）方法。

**【性状】**本品为淡黄色液体。

**【鉴别】**（1）取本品 2ml，加双缩脲试液（取硫酸铜 1.5g 和酒石酸钾钠 6.0g，加水 500ml 使溶解，边搅拌边加入 10%氢氧化钠溶液 300ml，用水稀释至 1000ml，摇匀）4ml，摇匀，放置 15 分钟，溶液应显蓝紫色至紫红色。

（2）照高效液相色谱法（中国药典 2020 年版四部通则 0512）测定。

供试品溶液 取本品适量，用水稀释制成每 1ml 中约含多肽 2.5mg 的溶液。

对照品溶液 取小牛脾提取物对照溶液作为对照品溶液。

系统适用性溶液 取色氨酸适量，加水溶解并稀释制成每 1ml 中约含 0.1mg 的溶液。

色谱条件 用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂（4.6mm $\times$ 250mm，4 $\mu$ m 或效能相当的色谱柱）；以磷酸盐溶液（取磷酸 1.0ml，三乙胺 0.5ml，加水 500ml）为流动相 A，磷酸-乙腈（1:1000）为流动相 B，按下表进行梯度洗脱；流速为每分钟 1.0ml；检测波长 280nm；柱温 30 $^{\circ}$ C；进样体积 5 $\mu$ l。

时间（分钟）	流动相 A（%）	流动相 B（%）
0	100	0
10	100	0
30	90	10
40	50	50
43	10	90
45	10	90

系统适用性要求 系统适用性溶液连续进样 5 次，主峰保留时间和峰面积的相对标准偏差分别不得过 1.0%和 2.0%；理论板数按色氨酸峰计算应不低于 50000。

测定法 取供试品溶液与对照品溶液，分别注入液相色谱仪，记录色谱图。

限度 按中药色谱指纹图谱相似度评价系统计算，供试品溶液色谱图与对照溶液色谱图的相似度（扣除色氨酸峰后）不得低于 0.90。

**【检查】pH 值** 应为 5.0~7.0（中国药典 2020 年版四部通则 0631）。

**蛋白质** 取本品 2ml，加 20%磺基水杨酸溶液 2ml，摇匀，不得发生混浊。

**高分子量物质** 照高效液相色谱法（中国药典 2020 年版四部通则 0512）测定。

**供试品溶液** 取本品，用流动相稀释制成每 1ml 中约含多肽 1mg 的溶液。

**对照品溶液** 取人胰岛素对照品（分子量 5808）适量，加流动相溶解并定量稀释制成每 1ml 中约含 1mg 的溶液。

**系统适用性溶液** 取核糖核酸酶 A（分子量 13700）、胰岛素（分子量 5808）、胸腺肽 a1（分子量 3108）、生长抑素（分子量 1638）对照品各适量，加流动相溶解并定量稀释制成每 1ml 中约含 1mg 的混合溶液。

**灵敏度溶液** 精密量取对照品溶液适量，用流动相定量稀释制成每 1ml 中约含 1 $\mu$ g 的溶液。

**色谱条件** 用凝胶色谱柱（TSK GEL 2000SWxl 7.8mm $\times$ 300mm，5 $\mu$ m 或效能相当的色谱柱）；以三氟乙酸-乙腈-水（0.05: 40: 60）为流动相；流速为每分钟 0.7ml；检测波长为 214nm；进样体积 20 $\mu$ l。

**系统适用性要求** 系统适用性溶液色谱图中，连续进样 3 次，各峰保留时间的相对标准偏差不得大于 2.0%；各相邻峰之间的分离度按峰高与峰谷之比计算均不得小于 2.0；以各峰的保留时间为横坐标，分子量对数为纵坐标进行线性回归，相关系数不得小于 0.99。对照品溶液色谱图中，理论板数按胰岛素峰计应不低于 3000。灵敏度溶液色谱图中，人胰岛素峰高的信噪比应不小于 10。

**测定法**：取供试品溶液与对照品溶液，分别注入液相色谱仪，记录色谱图，按面积归一化法计算（注：数据处理时，应在对照品主峰保留时间处对供试品溶液色谱图中的峰进行垂直分割处理）。

**限度** 供试品溶液色谱图中小于人胰岛素峰保留时间的各峰面积之和不得过 4.0%。小于灵敏度溶液主峰面积的色谱峰忽略不计。

**吸收度** 取本品，用水稀释制成每 1ml 中约含多肽 20 $\mu$ g 的溶液，照紫外-可见分光光度法（中国药典 2020 年版四部通则 0401）测定，在 260nm 与 280nm 波长处吸收度的比值应为 1.50~1.75。

**氨基酸** 用氨基酸分析仪或适宜的高效液相色谱仪测定。

**供试品溶液** 精密量取本品适量，用水定量稀释至适宜浓度，作为游离氨基酸供试品溶液。精密量取游离氨基酸供试品溶液适量，置玻璃水解管中，加等量浓盐酸，摇匀，将水解瓶充氮气，封口，于 110 $^{\circ}$ C 水解 20 小时。取出，放冷，启封，水浴蒸干或氮气吹干，残渣加水溶解并定量稀释至适宜浓度，作为总氨基酸供试品溶液。

**对照品溶液** 取 16 种氨基酸（门冬氨酸、谷氨酸、丝氨酸、甘氨酸、组氨酸、精氨酸、苏氨酸、丙氨酸、脯氨酸、酪氨酸、缬氨酸、甲硫氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、盐酸赖氨酸）对照品各适量，精密称定，加 0.1mol/L 盐酸溶液溶解并定量稀释制成适宜浓度的溶液。

**系统适用性要求** 对照品溶液色谱图中，各氨基酸峰之间的分离度均应不小于 1.0。

**测定法** 用适宜的氨基酸分析仪或高效液相色谱仪（建议方法见附 1，也可采用其他适宜的方法进行分离）分别测定游离氨基酸和总氨基酸含量。

**限度** 每 1ml 中含游离氨基酸应为 3.0~6.0mg，每 1ml 中总氨基酸与游离氨基酸之差不得少于 1.0mg。



**生物活性** 取本品适量，照 T 细胞活性测定法-脱 E 受体法（附 2）测定，供试品测定管 E 玫瑰花结百分率与脱 E 受体胸腺 T 细胞对照管 E 玫瑰花结百分率之差不得低于 10.0%。

**异常毒性** 取本品，用氯化钠注射液定量稀释制成每 1ml 中含多肽 2.5mg 的溶液，依法检查（中国药典 2020 年版四部通则 1141），按静脉注射法给药，应符合规定。

**细菌内毒素** 取本品，依法检查（中国药典 2020 年版四部通则 1143），每 1mg 多肽中含内毒素的量应小于 0.8EU。

**降压物质** 取本品，用氯化钠注射液定量稀释制成每 1ml 中含多肽 0.5mg 的溶液，依法检查（中国药典 2020 年版四部通则 1145），剂量按猫体重每 1kg 注射 0.2ml，应符合规定。

**【含量测定】多肽** 取本品适量，用水定量稀释制成每 1ml 中含多肽 0.1mg 的溶液，作为供试品溶液，精密量取 1ml，照蛋白质含量测定法（中国药典 2020 年版四部通则 0731 第二法方法 1）测定，对照品为血清白蛋白（牛）。

**核糖** 照紫外-可见分光光度法（中国药典 2020 年版四部通则 0401）测定。

**供试品溶液** 取本品适量，用 5%三氯醋酸溶液定量稀释制成每 1ml 中含核糖 5 $\mu$ g 的溶液。

**对照品溶液** 精密称取 D-核糖对照品适量，加 5%三氯醋酸溶液溶解并定量稀释制成每 1ml 中含 20 $\mu$ g 的溶液。

**测定法** 精密量取对照品溶液 0.0ml、0.2ml、0.4ml、0.6ml、0.8ml、1.0ml 分别置具塞试管中，分别加入 5%三氯醋酸溶液适量至 2.0ml，各加入 3, 5-二羟基甲苯溶液[取 3, 5-二羟基甲苯 1g，溶于 0.1%三氯化铁-盐酸溶液（取三氯化铁 0.5g，加浓盐酸溶解使成 500ml，可长期使用）100ml 中，临用新配] 2.0ml，摇匀，置水浴中准确加热 30 分钟，迅速冷却至室温，照紫外-可见分光光度法(中国药典 2020 年版通则 0401)，在 650nm 的波长处测定吸光度；以 0 号管作为空白。以浓度为横坐标，吸光度为纵坐标计算线性回归方程。另精密量取供试品溶液 2ml 置具塞试管中，自“各加入 3, 5-二羟基甲苯溶液 2.0ml”起，同法测定。从线性回归方程计算供试品溶液中的核糖含量。

**【贮藏】** 密闭，在凉暗处保存。

## 附 4

### 乳牛脾脏

#### 一、乳牛脾脏的来源

来源于规范饲养、屠宰的非疫区可供食用的健康乳牛（出生 24 小时内）脾脏为原料。

#### 二、乳牛脾脏的质控要求

### 乳牛脾脏

#### Runiupizhang

本品系采集自法定兽医部门检疫合格可供食用的健康乳牛的脾脏，用于小牛脾提取物溶液生产。采集的脾脏应采用适宜的方法进行种属确认。

**形状** 肉眼观察，呈前缘较平直，后缘略凸，两端圆，中部厚，边缘薄的长扁椭圆形。表面光洁、质地柔软、有弹性；无肿胀、无硬结。

**色泽** 肉眼观察，应呈栗红色或红褐色，颜色均匀，不得有胆绿色、胆黄色；及脱水风化现象。

**粘度** 外形完整，外附筋膜，有光泽，手感光滑

**气味** 具血腥味，无臭味或异味。

**纯度** 不得夹杂其他脏器组织或异物。

**新鲜度** 随机抽取待投料的小牛脾脏 20 个，绞碎，摇匀，取混合物适量，分成两份，每份用半微量定氮法（附 6）检测，计算两份挥发性盐基氮的均值，不得过 0.25mg/g。

**包装** 离体后置于洁净食品级塑料袋中，冷冻。

**贮存及有效期** 冷藏（4~8℃）不超过 48 小时；冷冻保存（<-18℃）不超过 1.5 年

**运输** 具有储存条件的运输车

## 附 5

### 小牛脾提取物注射液生产工艺

#### 1.基本要求

设施与生产质量管理按现行版《药品生产质量管理规范》要求实施。原材料应符合企业内控标准，辅料应符合现行版《中国药典》的相关要求。生产用水源水应符合国家饮用水标准，纯化水及注射用水应符合现行版《中国药典》标准。直接接触药液的生产用器具必须严格清洗。

小牛脾脏提取物系由健康乳牛脾脏（附 4）经去脂肪、匀浆、冻融、加热提取、超滤等工艺步骤提取制成。采集的脾脏应采用适宜的方法进行种属确认，生产工艺中应采用适宜的病毒灭活（去除）方法。

#### 2.生产工艺过程

2.1 乳牛脾脏冷冻保存（ $\leq -18^{\circ}\text{C}$ ），按企业内控标准检验合格方可使用。

用前除去筋膜和脂肪，冲洗。

2.2 匀浆破碎，匀浆液反复冻融三次，冷冻（ $\leq -20^{\circ}\text{C}$ ），融化（ $\leq 45^{\circ}\text{C}$ ）。

2.3 提取工艺，多次调节 pH 值，加热（升温至  $80^{\circ}\text{C}$ ，保温 30 分钟），降温，离心，过滤。

2.4 超滤工艺，经截留分子量小于 10000 道尔顿超滤设备多次超滤，得小牛脾提取物溶液。

2.5 取小牛脾提取物溶液，超滤；

2.6 加注射液用水至配液量；

2.7 除菌过滤；

2.8 灌封；

2.9 灯检；

2.10 包装。

## 附6

### 半微量定氮法

#### 1.1 原理

挥发性盐基氮是指动物组织由于酶和细菌的作用，在腐败过程中，使蛋白质分解而产生氨以及胺类等碱性含氮物质。此类物质具有挥发性，在碱性溶液中蒸发出后，用标准酸滴定，计算含量。

#### 1.2 试剂

1%氧化镁混悬液称取1.0g氧化镁，加100ml水，振摇成混悬液。

吸收液 2%硼酸溶液。

甲基红指示液 0.2%乙醇溶液。

次甲基蓝指示液 0.1%溶液。

临用时将上述两种指示液等量混合作为混合指示液。

0.005mol/L的硫酸滴定液。

#### 1.3 仪器 半微量定氮器（蒸馏装置见中国药典 2020年版四部通则 0704）。

微量滴定管：最小分度0.01ml。

1.4 操作方法 取小牛脾脏适量，切碎搅匀，精密称取适量（W），置于锥形瓶中，加100ml水，不时振摇，浸渍30min后离心，上清液量积（V3）后置冰箱备用，作为样品液。

预先将盛有10ml吸收液并加有5~6滴混合指示液的锥形瓶置于冷凝管下端，并使其下端插入锥形瓶内吸收液的液面下，精密量取5.0ml上述样品液于蒸馏器反应室内，加5ml 1%氧化镁混悬液，迅速盖塞，并加水以防漏气，通入蒸气进行蒸馏，由冷凝管出现第一滴冷凝水开始计时，蒸馏5分钟即停止，吸收液用0.005mol/L的硫酸滴定液滴定，终点至蓝紫色。同时做试剂空白试验。

#### 1.5 计算

$$X = (V_1 - V_2) \times N \times V_3 / (W \times 5\text{ml})$$

式中 X 为样品中挥发性盐基氮的含量，mg/g；

V1 为样品液消耗硫酸标准溶液体积，ml；

V2 为试剂空白消耗硫酸标准溶液体积，ml；

V3 为浸渍上清液体积，ml；

N 为硫酸标准溶液1毫升相当于0.1401mg的N；

W 为样品质量，g。