

## 乙型肝炎人免疫球蛋白抗-HBs 效价酶联免疫方法的建立

王静, 白亦昊, 周长明, 吕雯(北京市药品检验所, 北京 102206)

**摘要 目的:**建立酶联免疫法检测乙型肝炎人免疫球蛋白抗-HBs 效价的测定方法。**方法:**依据 2015 年版中国药典的规定,乙型肝炎人免疫球蛋白抗-HBs 效价采用酶联免疫法测定,并应用生物检定统计法中的量反应平行线法设计实验,检测实验可靠性,计算效价。**结果:**每次实验的可靠性均符合 2015 年版中国药典规定,可信限率在 10% 以内,专属性强,试剂盒和仪器因素检测结果经 F 检验,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),重复性 RSD 为 1.61%。当抗-HBs 效价在  $0.0512 \sim 0.1 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$  范围内时,标准品和样品线性相关系数均大于 0.99。7 批样品与厂家放射免疫法的结果经 F 检验,无统计学差异( $P > 0.05$ )。**结论:**乙型肝炎人免疫球蛋白抗-HBs 效价采用酶联免疫法测定,量反应平行线法分析,测定结果稳定、可靠,操作安全、快速、无污染,可用于乙型肝炎人免疫球蛋白抗-HBs 效价检测。

**关键词:**量反应平行线法;酶联免疫法;抗-HBs 效价;乙型肝炎人免疫球蛋白

中图分类号:R 921.2 文献标识码:A 文章编号:1009-3656(2017)-6-0000-0

## Establishment of the ELISA Method for Determination of Anti- HBs Potency of Human Hepatitis B Immunoglobulin

Wang Jing, Bai Yihao, Zhou Changming, Lü Wen(*Beijing Institute for Drug Control, Beijing 102206*)

**Abstract Objective:** To Establish the ELISA method to determine the anti-HBs potency of of human hepatitis B immunoglobulin. **Methods:** According to ChP 2015, the ELISA method was used to determine the anti-HBs potency of human hepatitis B immunoglobulin. Meanwhile, the quantity response parallel line analysis of bioassay-statistical was adopted to design the experiment. The reliability was evaluated then the potency was calculated. **Results:** The reliability of each experiment met the criteria in ChP 2015. The fiducial limit rate was within 10%, and the specificity was good. The test results by two different kits and instruments were analyzed by F test and there was no significant difference ( $P > 0.05$ ). The relative standard deviation (RSD) for reproducibility was 1.61%. There was good linearity ( $r > 0.99$ ) between anti-HBs potency and absorbance for the standard and test samples in the range of  $0.0512 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1} \sim 0.1 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ . The F test between our test results and manufacturers' test results obtained with radioimmunoassay for 7 batches of samples showed no statistical difference ( $P > 0.05$ ). **Conclusion:** The anti-HBs potency of human hepatitis B immunoglobulin are determined by the ELISA method and analyzed by the quantity response parallel line method. The test results are accurate and reliable. The operation is safe, rapid and pollution-free. The established ELISA method can be used for determination of anti-HBs potency of human hepatitis B immunoglobulin.

**Key words:** quantity response parallel line analysis; ELISA; anti-HBs potency; human hepatitis B immunoglobulin

乙型肝炎人免疫球蛋白是由高效价乙型肝炎表面抗体的健康人血浆,经低温乙醇蛋白分离法或经批准的其他分离法分离纯化,并经病毒去除和灭活

处理制成<sup>[1]</sup>。目前,乙型肝炎人免疫球蛋白抗-HBs 效价的检测方法主要采用放射免疫法,该方法操作复杂,检验成本高,对人员和环境存在放射污染风

第一作者简介:王静,主管药师。研究方向:药物分析。联系电话:13701364833

通讯作者简介:周长明,副主任药师。研究方向:药物分析。联系电话:010-52779652

险<sup>[2]</sup>。中国药典 2015 年版三部重新修订了乙型肝炎人免疫球蛋白抗-HBs 效价的检查,规定除使用放射免疫的方法外,还增加了经验证的酶联免疫法。因此,本实验按照中国药典生物检定统计法的规定建立了酶联免疫法检测乙型肝炎人免疫球蛋白抗-HBs 效价,并且对该方法进行了实验室内的方法学考察。

## 1 仪器与试剂

### 1.1 仪器

全自动酶标仪(MULTISKAN MK3), Thermo; 酶标分析仪(Spectra Max M2), Molecular Devices; 中国药典生物检定统计程序 BS2000, 中国食品药品检定研究院编制。

### 1.2 试剂

乙型肝炎人免疫球蛋白(批号 201606005、201608008、201608009、201611010、201611011、201611012、201612013), 华兰生物工程股份有限公司; 抗-HBs 免疫球蛋白国家标准品(含量  $2.5 \text{ IU} \cdot \text{支}^{-1}$ , 装量  $0.5 \text{ mL} \cdot \text{支}^{-1}$ , 批号 20041001), 购自中国食品药品检定研究院。生理盐水(批号 1607293203), 石家庄四药有限公司; 葡萄糖(批号 20150413), 国药集团化学试剂有限公司; 甘氨酸(含量 100.0%, 批号 140689-201605), 中国食品药品检定研究院; 乙型肝炎病毒表面抗体检测试剂盒(酶联免疫法)(批号 R20161009), 万泰生物药业; 乙型肝炎病毒表面抗体检测试剂盒(酶联免疫法)

(批号 20161110), 上海科华生物工程股份有限公司。

## 2 方法与结果

### 2.1 方法设计

依据中国药典 2015 年版四部生物检定统计法规定,采用量反应平行线 3.3 法设计实验,运用 BS2000 软件计算结果,每次实验均进行可靠性检验:回归、偏离平行、二次曲线、反向二次曲线,以及效价和可信限率计算<sup>[3-5]</sup>。

### 2.2 测定方法

1) 标准品 S1、S2、S3 的制备:取生理盐水 0.5 mL 将国家标准品稀释至  $5 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,再用稀释液稀释至终浓度分别为  $0.0512 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $0.064 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$  和  $0.08 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。2) 供试品 T1、T2、T3 的制备:根据标示量将待测样品(批号 201608008)用生理盐水稀释至终浓度分别为  $0.0512 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $0.064 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$  和  $0.08 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。3) 加样:标准品(S1-S3)与供试品(T1-T3)各 3 个剂量,每个剂量重复 6 次,加样次序见表 1,以减少加样次序所产生的实验误差。4) 实验步骤:按照万泰生物药业乙型肝炎病毒表面抗体检测试剂盒说明书对乙型肝炎人免疫球蛋白样品抗-HBs 效价进行测定, Thermo 全自动酶标仪 450/630 nm 波长下读数并记录结果。5) 数据统计分析和结果计算:根据中国药典 2015 年版四部规定,采用计算程序 BS2000 对实验数据进行分析。

表 1 加样次序

Tab. 1 The order of samples added

区组(Group) 1	区组(Group) 2	区组(Group) 3	区组(Group) 4	区组(Group) 5	区组(Group) 6
S1	S1	S1	T1	T1	T1
S2	S2	S2	T2	T2	T2
S3	S3	S3	T3	T3	T3
T1	T1	T1	S1	S1	S1
T2	T2	T2	S2	S2	S2
T3	T3	T3	S3	S3	S3

### 2.3 可靠性检验和可信限率

可靠性检验结果应为回归项非常显著( $P < 0.01$ ),偏离平行、二次曲线和反向二次曲线项均不显著( $P > 0.05$ ),实验才成立,并且根据样品的标示量计算出效价以及可信限率。结果表明,应用量反应平行线 3.3 法测定乙型肝炎人免疫球蛋白抗-HBs 效价,其常用对数浓度和吸光度

呈直线关系,标准品 S 和样品 T 的直线平行,回归有统计学差异( $P < 0.01$ ),偏离平行、二次曲线和反向二次曲线均无统计学差异( $P > 0.05$ ),并且可信限率在 10% 以内。

### 2.4 专属性考察

取用生理盐水配制的浓度为  $25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  甘氨酸溶液、浓度为  $28 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  葡萄糖溶液以及生理

盐水,按照试剂盒说明书对这 3 种样品进行检测。三种溶液的检测结果均呈阴性,表明该方法的专属性很强。

### 2.5 中间精密度考察

取乙型肝炎人免疫球蛋白样品(批号 201608008),按照“2.2”项检测效价。同一批样品分两组采用不同试剂盒和酶标仪测定(1组:万泰生物药业乙型肝炎病毒表面抗体检测试剂盒和 Thermo 全自动酶标仪;2组:上海科华生物工程股份有

限公司乙型肝炎病毒表面抗体检测试剂盒和 Molecular Devices 酶标分析仪),共 12 次检测结果计算相对标准偏差(RSD),并进行方差分析,对试剂盒和仪器两因素进行 F 检验。12 次检测结果的实验可靠性均通过,效价为  $116.32 \pm 2.64 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{支}^{-1}$ ,  $\text{RSD} = 2.3\%$ ,可信限率为  $7.32 \pm 1.62\%$ ,见表 2。采用 SPSS 统计软件,经 F 检验,  $P > 0.05$ ,所以在  $\alpha = 0.05$  水平上不同试剂盒和仪器因素均对该方法的中间精密度无统计学影响。

表 2 精密度试验测定结果

Tab. 2 The test results of precision

试验次数 (test number)	1 组(Group)		2 组(Group)	
	万泰试剂盒(Wan Tai Kits)/Thermo		科华试剂盒(Ke Hua Kits)/Molecular Devices	
	效价(PT) / $\text{IU} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{支}^{-1}$	置信限率(FL)/%	效价(PT) / $\text{IU} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{支}^{-1}$	置信限率(FL)/%
1	115.05	6.7272	115.66	8.5142
2	114.63	3.8632	115.71	8.3104
3	119.34	9.9050	120.25	7.4267
4	118.69	7.5729	112.5	6.5476
5	119.00	9.2944	111.94	5.8743
6	116.54	6.4798	116.52	7.3439

### 2.6 重复性考察

取乙型肝炎人免疫球蛋白样品(批号 201608008),按照“2.2”项检测效价,重复检测 6 次,计算 6 次检测结果的相对标准偏差(RSD)。经对重复性数据分析,该方法测得供试品效价为  $112.77 \pm 1.82 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{支}^{-1}$ ,  $\text{RSD} = 1.61\%$ ,可信限率为  $5.50 \pm 1.27\%$ 。见表 3。

表 3 重复性试验测定结果

Tab. 3 The test results of repeatability

批号 (batch number)	效价(PT) / $\text{IU} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{支}^{-1}$	置信限率(FL) /%
1	110.31	6.5469
2	111.79	4.4746
3	114.63	3.8632
4	113.01	4.7519
5	111.85	6.6072
6	115.05	6.7272

### 2.7 线性范围考察

用生理盐水将抗-HBs 国家标准品稀释成  $0.0512 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $0.064 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $0.08 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$  和  $0.1 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$  4 个梯度浓度,按照 2.2 项检测其吸光度值,以标准溶液抗-HBs 效价对数为横坐标,

吸光度值对数为纵坐标,重复测定 3 次,进行线性回归。用生理盐水将乙型肝炎人免疫球蛋白样品(批号 201608008)的抗-HBs 效价稀释成  $0.0512 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $0.064 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $0.08 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$  和  $0.1 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$  4 个梯度浓度,按照“2.2”项检测其吸光度值,以样品的抗-HBs 效价对数为横坐标,吸光度值对数为纵坐标,重复测定 3 次,进行线性回归。标准品和样品的线性相关系数均大于 0.99,表明浓度在  $0.0512 \sim 0.1 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$  范围内常用对数吸光度和浓度均呈现良好的线性关系。见表 4。

表 4 线性试验测定结果

Tab. 4 The test results of linearity

试验次数 (test number)	相关系数(r Values)	
	标准品 (Standard substance)	样品 (Sample)
	1	0.9968
2	0.9916	0.9966
3	0.9989	0.9989

### 2.8 样品测定

取 7 批乙型肝炎人免疫球蛋白样品,按照“2.2”项检测效价,并与厂家(放射免疫法)批签发结果比较,结果见表 5。可靠性检验均通过,用

SPSS 统计软件经 F 检验,  $P > 0.05$ , 所以在  $\alpha = 0.05$  水平上两种方法无统计学差异。

表 5 检测结果

Tab. 5 The test results of 7 batches of samples

试验次数 (test number)	效价 (PT) /IU · mL <sup>-1</sup>	厂家效价 (manufacturer PT) /IU · mL <sup>-1</sup>
201606005	140	123
201608008	113	118
201608009	130	124
201611010	120	130
201611011	128	115
201611012	114	136
201612013	108	118

### 3 讨论

#### 3.1 检测方法的确定

2015 年版中国药典重新修订了抗-HBs 效价的检测方法,除了放射免疫法,还增加了酶联免疫法测定效价。放射免疫法对环境和实验人员存在着放射危害,而酶联免疫法相对来说更安全。酶联免疫法常用于血浆中抗-HBs 的检测,但是对于生物制品中的抗-HBs 效价检测还很少有文献报道。抗-HBs 免疫球蛋白本身不是化学纯品,是不均匀的混合物,利用酶标仪的紫外吸收波长判定结果会产生一定的误差,不够精准,因此不能用一般的标准曲线法计算效价。本研究在酶联免疫法的基础上结合了生物统计量反应平行线法分析,每次实验的可靠性检验均能通过,才能保证实验数据的真实可靠。

#### 3.2 标准品溶液浓度的确定

酶联免疫法实验中酶标仪的测量值(OD 值)范围一般在 0.1~3 之间,高值的 OD 值不稳定,因此选用中低值区的 OD 值。依据相邻高低剂量组的比值( $r$ )要相等的原则,选择  $r = 1:0.8$ ,并经反复试验,最终确定将标准品稀释成 0.0512 IU · mL<sup>-1</sup>、0.064 IU · mL<sup>-1</sup>和 0.08 IU · mL<sup>-1</sup>三个浓度进行测定。

#### 3.3 稀释剂和试剂盒的选择

乙型肝炎人免疫球蛋白属于血液制品,选择生理盐水作为稀释剂更接近人体液浓度,对效价的影响较小。乙型肝炎抗体试剂盒(酶联免疫法)市售有定性和定量两种,它们的检测原理相同,定量试剂盒有不同浓度的标准品,但该标准品并不适用于本实验,故选用了定性试剂盒检测。

#### 3.4 方法适用性

对于本品种的可信限率虽没有明确规定,但得到的结果都能控制在 10% 以内。该方法具有精密度高、专属性强和重复性好的特点,线性相关系数大于 0.99。7 批样品均通过可靠性检验,且与厂家放射免疫法的结果比较,无统计学差异。改变实验室内部条件(如不同日期、不同分析人员、不同仪器)可以考察测定结果的精密度,本次试验过程中发现实验人员操作稳定性和一致性对实验结果影响较大,可以通过加强对实验者的培训,统一规范实验标准,减少实验者造成的实验变异<sup>[6]</sup>。增加每次实验中对照品和样品的重复次数,也能有效的减少实验变异,但重复次数过多会使操作繁琐,因此在实验设计上还有待进一步优化。

本研究按照中国药典规定通过了方法验证,为酶联免疫法检测乙肝人免疫球蛋白抗-HBs 效价提供了可靠地检测方法和数据支撑。

#### 参考文献

- [1] 中国药典[S]. 2015 年版. 三部: 252  
ChP[S]. 2015. Vol III :252
- [2] 邱芳, 吴泽良. 放射免疫法和酶联免疫法检测人血浆乙肝表面抗体效价比较[J]. 江西医药, 2012,47( 2): 178.  
Qiu Fang, Wu Zeliang. Comparison of radioimmunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay for determination of hepatitis B surface antibody in human plasma [J]. Jiangxi Med J, 2012, 47 (2):178
- [3] 中国药典[S]. 2015 年版. 四部: 182  
ChP[S]. 2015. Vol IV :182
- [4] 张媛, 谭德讲. 中国药典生物检定统计实例不同计算方式结果比较和几点修改建议[J]. 药物分析杂志, 2013, 33( 11): 1858  
Zhang Yuan, Tan Dejiang. Comparison of results of bioassay examples in Chinese pharmacopeia with different calculation methods and some revising suggestions [J]. Chin J Pharm Anal, 2013, 33 ( 11): 1858
- [5] 项荣武, 梁露花, 党丹, 等. 中、美、欧药典关于生物检定统计法的比较[J]. 沈阳药科大学学报, 2014,31(10): 819  
Xiang Rongwu, Liang Luhua, Dang Dan, et al. Comparison of bioassay-statistical method in ChP, USP and EP [J]. J Shenyang Pharm Univ,2014, 31(10): 819
- [6] 冯国双, 谭德讲. 方差成分模型在生物活性测定实验中间精密度分析中的应用[J]. 药物分析杂志, 2013,33(11): 1836  
Feng Guoshuang, Tan Dejiang. Application of variance component model for calculating intermediate precision in bioassay [J]. Chin J Pharm Anal, 2013, 33( 11): 1836

(收稿日期:2017-07-24)