

发色底物法测定注射用降纤酶中类凝血酶的含量

雷丹青, 刘绵林, 周先丽(广西医科大学蛇毒研究所, 广西 南宁 530021)

摘要:目的 建立发色底物法测定注射用降纤酶类凝血酶的方法。方法 以 Be-Phe-Val-Arg-PNA 为发色底物, 检测波长 405nm。结果 降纤酶在 2~10 单位/mL 范围内呈良好的线性关系, $r=0.9993$ ($n=5$)。结论 本法简便, 准确, 专属性强, 适用于产品的质量控制。

关键词:降纤酶; 类凝血酶; 发色底物; 含量测定

中图分类号: R927.2 文献标识码: B 文章编号: 1007-7693(2005)06-0482-02

Determination of thrombin-like in defibrase for injection by chromogenic substrate

LEI Dan-qing, LIU Mian-lin, ZHOU Xian-li(*The Institute of Snake Venom Research of Guangxi Medical University, Nanning, 530021, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE A chromogenic substrate method was developed for the determination of thrombin-like in defibrase for injection. **METHODS** Chromogenic substrate was Be-Phe-Val-Arg-PNA. The detection was made at 405nm. **RESULTS** The calibration curve of thrombin-like had good linear relationship in the range of 2~10unit/mL($r=0.9993, n=5$). **CONCLUSION** The developed chromogenic substrate method is simple, accurate and specific, and could be used as the quality control for thrombin-like in defibrase for injection.

KEY WORDS: defibrase; thrombin-like; chromogenic substrate; determination

注射用降纤酶是由蛇毒类凝血酶加上赋形剂组成的制剂, 它通过裂解血液中纤维蛋白原的 A 链, 生成可溶性纤维蛋白并激活血管内皮释放组织型纤维蛋白溶酶原激活物(t-PA), 发挥抗血栓的作用。国家药品标准其原料及制剂酶活性的测定方法均采用凝固法, 该法操作目测判断纤维蛋白原凝固时间, 受检测者主观干扰较大, 且制剂中加入的赋性剂和钙离子对凝固时间产生很大的影响。为了保证含量测定的准确性, 笔者采用发色底物法测定降纤酶中类凝血酶含量, 方法简便, 准确, 可靠, 适用于原料及制剂的质量控制。

1 仪器与试剂

53WBUV/VIS 型分光光度计, 上海光学仪器厂, 比色皿光径 10mm, 宽 4mm。降纤酶对照品(中国药品生物制品检定所); 注射用降纤酶(广西医科大学制药厂, 规格: 每支 5 单位内含类凝血酶和 1% 右旋糖酐); 发色多肽底物 Bz-Phe-Val-Arg-PNA(S-2160 上海东风生化技术有限公司)。三羟甲基氨基甲烷(Tris)和冰醋酸等试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 溶液配制

2.1.1 $0.1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (pH 8.5) Tris-咪唑缓冲液配制 Tris 6.055 g, 咪唑 3.404g, $12\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 1.22mL, 定容至

500mL。

2.1.2 对照品溶液 用上述缓冲液作溶剂配成 50 单位/mL 降纤酶对照品。

2.1.3 发色肽溶液($5\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 50mg Be-Phe-Val-Arg-PNA(S-2160)加 80mL 蒸馏水, 加热溶解后冷却至室温, 定容至 100mL。

2.1.4 样品溶液 取注射用降纤酶 10 瓶(5 单位/瓶), 每瓶分别用 1mL 缓冲液充分溶解后, 倒入 25mL 三角烧瓶中, 混匀备用。

2.1.5 辅料溶液 按制剂处方(不加降纤酶)和样品溶液制备方法, 制成辅料溶液。

2.2 测定方法

2.2.1 凝固法 按国家药品标准注射用降纤酶质量标准 WS₁-XG-032-2000 方法测定, 将降纤酶对照品分别配成 2.5, 5.0, 10, 20 单位/mL, 以对照品量(单位)对数为横坐标, 凝固时间对数为纵坐标绘制标准曲线, 计算的回归方程为: $Y=2.12X-0.98, r=-0.991$ 。

2.2.2 发色底物法或供试品用缓冲溶液稀释 取 1mL 分别加入试管中, 分别加入 1mL 发色肽溶液于 37℃ 保温 30min, 加 50% 的冰醋酸 0.2mL 终止反应, 反应在分光光度计上以

基金项目: 广西壮族自治区自然科学基金资助项目(0342002-4)

作者简介: 雷丹青, 女, 41 岁, 副研究员, 硕士生导师。主要从事蛇毒活性蛋白及毒理学研究。E-mail: ldq0422@Yahoo.com.cn Tel: 0771-5358549

405nm 波长测定吸光度(A 值),以 A 值为横坐标,对照品含量为纵坐标,进行直线相关分析,由供试品 A 值求出相应的供试品含量。

2.3 标准曲线的可靠性

每一浓度重复三管,精密吸取对照品溶液 0,40,80,120,160,200μL 分别置于试管中,加缓冲液至 1mL 作为标准曲线。取供试品溶液 1mL 于待测试管中,将上述各管分别加入 S-2160 1mL ,混匀,37℃ 保温 30min,加入 0.2mL 冰醋酸终止反应。以标准系列中不含降纤酶对照品管调零点,在分光光度计上测各管 A₄₀₅ 值。以吸光度及对照品量(单位)绘制标准曲线,计算的回归方程为($n = 5$): $Y = 0.0773X + 0.0481, r = 0.9993$ 。

结果表明降纤酶在 2 ~ 10 单位/mL 内呈良好的线性关系。

2.4 重复性试验

照“2.1.4”项下方法制备样品溶液,三批样品,每批 10 瓶,另按“2.1.2”项下方法制备对照品溶液;依上法平行测定,计算样品的含量和精密度(RSD)。方法的精密度测定结果为 1.4% ($n = 3$)。结果表明,本法精密度良好。

2.5 专属性

对空白辅料、降纤酶对照品、注射用降纤酶样品,含 2% CaCl₂ 样品,在给定反应条件下与凝固法进行比较。

3 讨论

注射用降纤酶是由蛇毒类凝血酶加赋型剂组成的生物制剂,主要用于治疗血栓性疾病,脑梗死,股动脉栓塞,肺栓塞。其成分中类凝血酶含量的准确确定对疗效起关键性作用。注射用降纤酶常用的测定方法是凝固法,赋形剂和离

表 1 注射用降纤酶专属性试验结果(标示量%, $n = 5$)

Tab 1 Assay results of specific for defibrase (labeled amount%, $n = 5$)

样品	凝固法		发色底物法	
	时间(s)	含量(%)	A ₄₀₅	含量(%)
空白辅料	—	0	0	0
5 单位降纤酶对照品	27.8	97.6	0.316	99.4
5 单位降纤酶对照品 + 1% 右旋糖酐	17.4	156	0.315	99.0
5 单位降纤酶对照品 + 2% CaCl ₂	16.6	167	0.317	99.8
注射用降纤酶	22.9	118	0.286	87.0
注射用降纤酶 + 2% CaCl ₂	16.8	163	0.282	85.1

子含量对测定结果产生很大影响。本实验类凝血酶作用于发色肽 S-2160,释放出对硝基苯胺(PNA),PNA 在 405nm 处有强吸收峰,其显色程度与类凝血酶含量成正比,且该试验不受降纤酶制剂中赋形剂右旋糖酐干扰,也不受钙离子影响,因此比肉眼观察的凝固法准确、特异、简单、快速,适于降纤酶原料、半成品、成品的含量测定与常规质量控制。

参考文献

[1] 管利丰,戚正武. 发色多肽底物及其临床应用[J]. 中华血液学杂志, 1985,6(3):174.
[2] 严慧敏,黄济群,廖兆全. 凝血酶底物发色肽的化学合成[J]. 广州医学院学报, 1995,23 (5):33.