

试剂盒法和福林酚法测定鹿瓜多肽注射液中多肽的比较研究

周朝东, 苏 喆, 黄哲甦

天津市药品检验研究院, 天津 300070

摘要: 目的 采用 Pierce™ Quantitative Colorimetric peptide assay 试剂盒 (试剂盒法) 和福林酚法分别测定鹿瓜多肽注射液中多肽, 对两种测定方法的优劣进行比较。方法 考察试剂盒法的检测限、线性关系、准确度和精密度试验以及福林酚法的线性关系、准确度和精密度试验, 采用试剂盒法和福林酚法分别测定鹿瓜多肽注射液中多肽, 并对两种方法的测定结果进行配对 *t* 检验比较两种方法的优劣。结果 试剂盒法和福林酚法的方法学参数均符合要求, 统计结果显示两种方法测得结果之间没有显著差异, 同时发现, 试剂盒法比福林酚法操作简单、快捷。结论 试剂盒法可以用于鹿瓜多肽注射液中多肽的测定, 比福林酚法操作简单、耗时少、通量大, 特别适合大批量样品的快速测定。

关键词: 鹿瓜多肽注射液; 多肽; 试剂盒法; 福林酚法; 配对 *t* 检验

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2020)09-1750-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2020.09.003

Comparative study on polypeptides in Cervus and Cucumis Polypeptide Injection by kits method and foline-phenol method

ZHOU Chao-dong, SU Zhe, HUANG Zhe-su

Tianjin Institute for Drug Control, Tianjin 300070, China

Abstract: Objective To determine the polypeptides in Cervus and Cucumis Polypeptide Injection by the Pierce™ Quantitative Colorimetric peptide assay kits (kits method) and foline-phenol method, and compare the advantages and disadvantages of the two methods. **Methods** The limit of detection, linearity, accuracy, and precision of the kits method and the linearity, accuracy, and precision of the foline-phenol method were studied, then the polypeptides contents of Cervus and Cucumis Polypeptide Injection were used to determine by two methods. The results of the two methods were tested by paired *t*-test and the advantages and disadvantages of the two methods were compared. **Results** The kits method and the foline-phenol method were both complied with the requirements. The statistics results showed that there were no significant difference between two methods. The kits method was simple and fast than the foline-phenol method. **Conclusion** The kits method is also suitable for the determination of the polypeptide contents of Cervus and Cucumis Polypeptide Injection and it is more simple, time-saving, and high flux than the foline-phenol method, and especially suitable for rapid determination of large quantities of samples.

Key words: Cervus and Cucumis Polypeptide Injection; polypeptides; kits method; foline-phenol method; paired *t* test

鹿瓜多肽注射液是由鹿科动物梅花鹿 *Cervus nippon Temminck* 的骨骼和葫芦科植物甜瓜 *Cucumis melo* L. 的干燥成熟种子, 经分别提取后制成的灭菌水溶液。鹿瓜多肽注射液具有促进骨痂形成, 诱导新骨生成, 促进骨折修复和抗炎镇痛作用, 用于治疗风湿、类风湿性关节炎、强直性脊柱炎、各类型骨折、创伤修复和腰腿疼痛等疾病^[1-3]。由于鹿瓜多肽注射液中有有效成分是多肽类物质, 为了能

够对产品的有效性进行质量控制, 其质量标准 WS1-XG-002-2002 中对多肽进行了限度规定, 要求 1 mL 中含多肽类物质以牛血清白蛋白计应不得少于标示的多肽含量^[4]。目前《中国药典》2015 年版四部通则 <0731> 收载的蛋白质测定法共有 6 种方法, 分别是凯氏定氮法、福林酚法、双缩脲法、BCA 法、考马斯亮蓝法和紫外可见分光光度法^[5]。鹿瓜多肽注射液采用福林酚法测定多肽。由于干扰福林

收稿日期: 2020-07-13

基金项目: 2019 年国家药品抽检中央补助地方经费项目 (153); 天津市市场监督管理委员会科技计划项目 (2020-W26)

作者简介: 周朝东 (1982—), 男, 主管药师, 从事生化药品与生物制品检验。E-mail: zhouchaodong0517@163.com

酚法测定的影响因素较多,同时测定过程相对繁琐,尤其不利于大批量样品的测定。为了对鹿瓜多肽注射液质量标准中的多肽测定方法进行改进优化,本研究通过前期的筛选比较,选择了 Thermo 公司的 Pierce™ Quantitative Colorimetric peptide assay 试剂盒对鹿瓜多肽注射液中多肽进行测定,同时对试剂盒法和福林酚法开展了比较研究。

1 仪器与试剂

UV-2450 型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司); Varioskan Flash 多功能酶标仪(美国 Thermo 公司); XS205 型十万分之一电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司)。

鹿瓜多肽注射液(哈尔滨誉衡制药有限公司生产,规格 2 mL:4 mg)为 2019 年度国家评价性抽验品种,共 34 批次; Pierce™ Quantitative Colorimetric peptide assay 试剂盒(美国 Thermo 公司,批号 UD286404C); 福林酚试剂(北京 Solarbio 公司,批号 321L031); 胸腺法新对照品(中国食品药品检定研究院,批号 140760-201603,质量分数 93.3%); 牛血清白蛋白(美国 Sigma 公司,批号 SLBC3968V); 氢氧化钠、碳酸钠、酒石酸钾和硫酸铜均为国产分析纯试剂;水为纯化水。

2 方法和结果

2.1 试剂盒法

2.1.1 对照品溶液的制备 对照品贮备液为牛血清白蛋白溶液,由试剂盒提供。质量浓度为 1 000 μg/mL,测定时按试剂盒使用说明书用水进行 2 倍梯度稀释至 500、250、125、62.5、31.25、15.625、0 μg/mL,共 8 个质量浓度点。

2.1.2 供试品溶液的制备 将样品按多肽标示量用水稀释至含多肽 250 μg/mL。

2.1.3 线性范围和测定方法 按照试剂盒使用说明书操作。取上述 8 个质量浓度对照品溶液和供试品溶液各 20 μL,分别加入到 96 孔透明板中,均做 3 复孔;用排枪每孔加入 180 μL 反应溶液(反应溶液配比为: Reagent A、Reagent B、Reagent C 比例为 50:48:2, Reagent A、B、C 由试剂盒提供);用胶膜纸封住 96 孔板,500 r/min 振摇 1 min;室温反应 30 min 后,用酶标仪在 480 nm 波长处测定吸光度值。以质量浓度为横坐标,吸光度值为纵坐标进行线性回归,得方程 $A=0.002\ 120\ C+0.038\ 186$, $r^2=0.996\ 0$,结果表明多肽在 15.625~1 000 μg/mL 时质量浓度与吸光度值线性关系良好。

把供试品溶液的平均吸光度值代入方程,计算供试品溶液中多肽的质量浓度,乘以稀释倍数再除以标示量,计算出供试品中多肽相对于标示量的质量分数。

2.1.4 检测限(LOD)的测定 检测限为产生比空白对照吸光度(A)值高 2~3 个 SD 的那个质量浓度^[6]。本法中, $A_{\text{空白}}=0.853\ 131$, $SD_{\text{空白}}=0.012\ 24$, $A_{\text{空白}}+3\times SD_{\text{空白}}=0.889\ 849$, $A_{15.625\ \mu\text{g/mL}}=0.891\ 157>0.889\ 849$,故最低检测限为 15.625 μg/mL。

2.1.5 重复性试验 取批号为 181104 的鹿瓜多肽注射液样品,平行制备 6 份供试品溶液,进行测定。结果鹿瓜多肽注射液样品中多肽的质量分数为 118.2%,RSD 值为 1.4%。

2.1.6 准确度试验 精密称取胸腺法新对照品适量,制成 1 000 μg/mL 的溶液。分别精取该溶液适量,加水稀释制成含胸腺法新 200、250、300 μg/mL 的溶液。取批号为 181202 的鹿瓜多肽注射液样品,制备供试品溶液,分别与含胸腺法新 200、250、300 μg/mL 的溶液等体积混匀,制成 80%、100%、120% 的加样回收溶液,每个质量浓度测定 3 份,共 9 份样品。结果平均加样回收率为 99.4%,RSD 值为 3.0%。

2.2 福林酚法

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取牛血清白蛋白适量,加水溶解并稀释制成 0.2 mg/mL 的溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 将鹿瓜多肽注射液样品按多肽标示量加水稀释,得含多肽 100 μg/mL 的溶液。

2.2.3 线性范围和测定方法 精密量取牛血清白蛋白对照品溶液 0.0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 和供试品溶液 1.0 mL 分别置具塞试管中,各加水至 1.0 mL,再分别加入碱性铜试液 1.0 mL,摇匀,室温放置 30 min,照紫外-可见分光光度法在 650 nm 的波长处测定吸光度值;同时以 0 号管作为空白。以对照品溶液质量浓度与其对应的吸光度值计算线性回归方程,得方程 $A=0.003\ 288\ C+0.025\ 2$, $r^2=0.999\ 0$,结果表明多肽在 39.5~197.4 μg/mL 时质量浓度与吸光度值的线性关系良好。

把供试品溶液测定的吸光度值代入方程进行多肽的计算。

2.2.4 重复性试验 取批号 181111 鹿瓜多肽注射液样品,平行制备 6 份供试品溶液,进行测定。结果鹿瓜多肽注射液中多肽的质量分数为 105.2%,

RSD 值为 2.1%。

2.2.5 准确度试验 分别精密量取牛血清白蛋白对照品溶液适量，加水稀释制成 0.05、0.10、0.15 mg/mL 的溶液。取批号 181028 鹿瓜多肽注射液样品，制备供试品溶液，然后分别与含牛血清白蛋白 0.05、0.10、0.15 mg/mL 的溶液等体积混匀，制成 50%、100%、150% 的加样回收溶液，每个质量浓度测定 3 份，共 9 份样品。结果平均加样回收率为 98.7%，RSD 值为 5.3%。

2.3 两种方法测定结果比较

34 批鹿瓜多肽注射液样品采用试剂盒法和福林酚法测定的结果折线图见图 1。可以看出鹿瓜多肽注射液中多肽质量分数均在 105%~130%。根据鹿瓜多肽注射液质量标准 WS1-XG-002-2002 中的限度规定，34 批次样品的多肽含量测定结果均符合标准规定。

采用 SPSS 19 软件对试剂盒法和福林酚法的测定结果进行配对 *t* 检验并分析，设临界水平 $\alpha=0.05$ ，数据分析结果见表 1。可以看出两种方法的测定结果显著性 $P=0.225>0.05$ ，说明结果差异不显著。

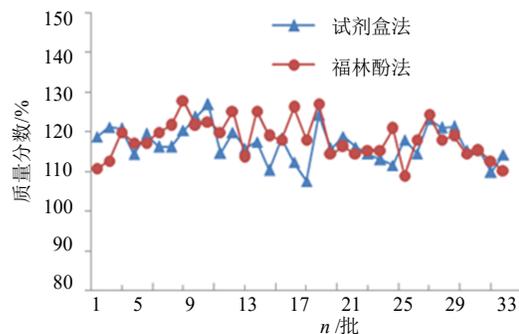


图 1 两种方法测定鹿瓜多肽注射液中多肽含量折线图
Fig. 1 Line chart of polypeptide content in Cervus and Cucumis Polypeptide Injection by two methods

表 1 试剂盒法和福林酚法测定结果的配对 *t* 检验

Table 1 Paired *t* test for the results of kits method and foline-phenol method

方法	质量分数均值/%	n/批	标准差/%	<i>P</i> 值
试剂盒	117.1	34	4.37	0.225
福林酚	118.2	34	4.89	

3 讨论

福林酚法多用于生化药品中蛋白质含量的测定，其显色原理为：第一步，在碱性条件下，蛋白质中的肽键与铜结合生成紫色络合物；第二步，福林酚试剂中的磷钼酸盐-磷钨酸盐被络合物及蛋白质中的酪氨酸、色氨酸等残基还原，产生磷钼蓝和磷钨蓝的蓝色混合物^[7]。福林酚法的优点是灵敏度较高，缺点是易受干扰物质的影响。干扰物质包括还原物质、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^[5]。鹿瓜多肽注射液的质量标准 WS1-XG-002-2002 中采用福林酚法测定多肽含量，但该方法存在的问题是对照品溶液和供试品溶液溶解稀释时使用的溶剂不一致。供试品溶液采用 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液作为稀释用溶剂，而对照品牛血清白蛋白用水作为溶解稀释用溶剂。经过实验发现用 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液作为溶剂时其测定结果高于用水作为溶剂时的测得结果。故建议使用水作为对照品溶液和供试品溶液的溶解稀释用溶剂，以保持两者之间溶剂的一致性，同时亦能保证实验结果的准确性。

此外，福林酚法测定样品时，随着时间的变化，对照品溶液和供试品溶液的吸光度值会越来越大，但样品的测定结果却会变小，故显色后需要立即测定。由于实验时每批样品需要制备 2 份平行样品，在采用紫外-可见分光光度计测定每一份供试品时均需用待测样品对比色池进行涮洗，然后倒入待测样品，并用纸巾擦干比色池外壁的液体，最后再放入仪器内进行测定。因此，对于多批次样品来说，样品测定会持续较长时间，所以先测定的样品结果会大于后测定的样品结果。

Thermo 公司 PierceTM Quantitative Colorimetric peptide assay 试剂盒主要针对 BCA 中的反应试剂进行了改进，增加了 Thermo 公司的专利螯合剂。在反应中，通过双缩脲反应， Cu^{2+} 在碱性条件下被肽键还原成 Cu^+ ，随后与螯合剂形成在 480 nm 波长处有最大吸收的复合物。该试剂盒的灵敏度比 BCA 法高 3~4 倍，而且试剂盒本身提供高质量的多肽对照品溶液，无需另行配制，同时采用酶标仪对 96 孔板进行读数，因此整个操作过程简单、快速、高通量，特别适合大批量样品中多肽含量的测定。

参考文献

- [1] 古英, 钟晓鸣, 王芳. 鹿瓜多肽注射液在风湿病中的治疗机制及临床应用 [J]. 中医临床研究, 2012, 4(18): 119-122.
- [2] Lin Z M, Liu Y T, Xu Y S, *et al.* Cervus and cucumis peptides ameliorates bone erosion in experimental arthritis by inhibiting osteoclastogenesis [J]. *Lupus Sci Med*, 2019, 6: 1-10
- [3] Han D C, Long A H, Wang J L, *et al.* Effect of cervus and cucumis polypeptide combined with zoledronic acid on bone metabolic biochemical markers in glucocorticoids-induced osteoporosis patients [J]. *Saudi J Biol Sci*, 2019, 26(5): 1027-1031.
- [4] 国家食品药品监督管理局. 国家药品标准 WS1-XG-002-2012 [S].
- [5] 中国药典 [S]. 四部. 2015.
- [6] 王军志. 生物技术药物研究开发和质量控制 [M]. 第3版. 北京: 科学出版社, 2018: 150-151.
- [7] 贺建华, 鹿麟, 邵纯君, 等. 福林酚法与考马斯亮蓝法测定甘露聚糖肽口服溶液中蛋白质含量的比较 [J]. 中国药师, 2017, 10(20): 1861-1863.