

水蛭仿生酶解小肽的含量测定方法

邱学伟¹, 杨培民², 代龙¹, 刘国飞^{3*}

(1. 山东中医药大学, 济南 250355; 2. 山东中医药大学附属医院, 济南 250011;
3. 北京和润创新医药科技发展有限公司, 北京 100021)

[摘要] 目的: 建立水蛭仿生酶解小肽的含量测定方法。方法: 以氨基酸分析仪测定结果为参照, 采用双缩脲法、2010 年版《中国药典》二部附录收录的 Lorry 法、2010 年版《中国药典》三部附录收录的 Lorry 法、茚三酮法等 4 种常用蛋白含量测定方法对 3 批样品进行总肽的含量测定。结果: 2010 年版《中国药典》三部收录的 Lorry 法测定的总肽含量不仅准确度高而且重复性、稳定性均好。结论: 确定 2010 年版《中国药典》三部收录的 Lorry 法作为水蛭仿生酶解小肽的含量测定方法。

[关键词] 水蛭; 肽含量; 双缩脲法; Lowry 法; 茚三酮法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)08-0060-03

Method for Determination of Small Bionic Zymolysis Peptides of Leeches

QIU Xue-wei¹, YANG Pei-min², DAI Long¹, LIU Guo-fei^{3*}

(1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China;
2. The Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250011, China;
3. Beijing He-Run Innovative Medical Technology Development Co. Ltd, Beijing 100021, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the quality standards of the method for determination of small bionic zymolysis peptides of leeches. **Method:** Biuret method, Lorry method in China pharmacopoeia 2010 (vol. II and vol. III), the ninhydrin colorimetry method were used to determine the content of total peptide with amino acid analyzer determination result for reference. **Result:** The content of total peptide determined by Lorry method in China pharmacopoeia 2010 (vol. III) was not only accurate but also repeatable and stable. **Conclusion:** Determination with Lorry method in China pharmacopoeia 2010 (vol. III) is confirmed as a valid content determination method of small bionic zymolysis peptides of leeches.

[Key words] leeches; content determination; biuret method; Lowry method; ninhydrin colorimetry method

水蛭仿生酶解小肽是中药材水蛭的细粉采用仿生酶解得到的小肽混合物, 其相对分子质量小于 3 000。目前, 蛋白含量测定方法有很多种, 不同的蛋白含量测定方法都有其优点和局限性, 但真正适合

于测定小分子混合肽类含量的方法报道却很少。本文旨在寻找适合水蛭仿生酶解小肽的含量测定方法, 为水蛭仿生酶解小肽质量标准的制定提供参考。

1 仪器与试剂

UV-1100 型紫外-可见分光光度计; 全自动氨基酸分析仪 (Biochrom31); KQ-250E 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); 水蛭仿生酶解小肽 (自制, 批号 100912, 101003, 101006); 比伐芦定对照品 (上海肽仕生物科技有限公司, 批号 091120); 异亮氨酸对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号 200805); 双缩脲试剂、碱性铜试液、福林酚试剂贮备液、磷酸盐缓冲液 (pH 6.8)、茚三酮试液均按照

[收稿日期] 20101123(004)

[基金项目] 科技部“重大新药创制”科技重大专项 (2009ZX09103-368)

[第一作者] 邱学伟, 在读硕士研究生, 从事中药制剂工艺及质量标准的研究, Tel: 0531-82960689, E-mail: privateqxw@126.com

[通讯作者] * 刘国飞, 本科, 主要从事中药新药开发, Tel: 0531-82960689, E-mail: dllab@163.com

2010年版《中国药典》有关项下配制。

2 方法

2.1 双缩脲比色法^[1] 取比伐芦定对照品适量,精密称定,加水溶解并制成每1 mL含15.08 mg的溶液,精密量取对照品溶液0,0.2,0.4,0.6,0.8,1.0 mL,分别置具塞试管中,各加水至1.0 mL,再分别加入双缩脲试剂4.0 mL,立即混匀,室温放置30 min,照紫外-可见分光光度法,在540 nm的波长处测定吸光度(A);同时以0号管为空白。以对照品溶液浓度与其相对应的吸光度(A)计算线性回归方程, $Y=0.0162X+0.0724$ ($r=0.9996$)。另精密取水蛭仿生酶解小肽0.4 g,精密加水40 mL,超声处理(功率250 W,频率40 Hz)30 min,滤过,精密量取续滤液1.0 mL,同法测定。从线性回归方程计算供试品溶液中蛋白浓度,并乘以稀释倍数,计算,即得(表1,图1)。

表1 4种方法测得固形物中总肽含量($\bar{x} \pm s$)

批次	双缩脲法	Lorry法I	Lorry法II	茚三酮法
100912	41.1 ± 0.65	74.2 ± 4.05	79.8 ± 0.43	66.2 ± 0.25
101003	43.4 ± 0.80	84.0 ± 3.99	82.9 ± 0.48	68.8 ± 0.30
101006	47.5 ± 0.73	91.7 ± 3.96	85.5 ± 0.39	70.5 ± 0.26

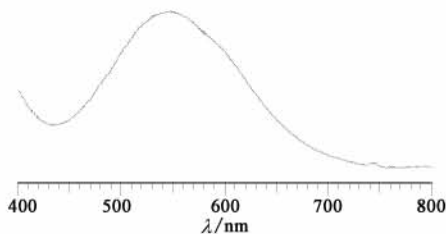


图1 比伐芦定双缩脲法紫外吸收光谱

2.2 Lorry比色法I^[2] 取比伐芦定对照品适量,精密称定,加水溶解并制成每1 mL含0.423 mg的溶液,精密量取对照品溶液0,0.2,0.4,0.6,0.8,1.0 mL,分别置具塞试管中,各加水至1.0 mL,再分别加碱性铜试液1.0 mL,摇匀,各加入福林酚试液(取福林酚试剂贮备液1~16)4.0 mL,立即混匀,置55℃水浴中准确反应5 min,置冷水浴10 min,照紫外-可见分光光度法,在650 nm的波长处测定吸光度(A);同时以0号管为空白。以对照品溶液浓度与其相对应的吸光度(A)计算线性回归方程, $Y=1.0449X+0.0988$ ($r=0.9979$)。另精密量取2.1项下的供试品溶液10 mL,置100 mL量瓶中,加水至刻度,摇匀,精密量取0.3 mL,同法测定。从线性回归方程计算供试品溶液中蛋白浓度,并乘以稀释倍数,计算,即得(表1,

图2)。

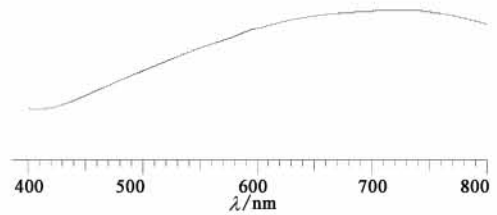


图2 比伐芦定Lorry法I紫外吸收光谱

2.3 Lorry比色法II^[3] 精密量取2.2项下对照品溶液0,0.2,0.4,0.6,0.8,1.0 mL,分别置具塞试管中,各加水至1.0 mL,再分别加碱性铜试液5 mL,摇匀,室温放置10 min,快速加入福林酚试液(取福林酚试剂贮备液1~2)0.5 mL,摇匀,室温放置30 min,显色后,照紫外-可见分光光度法,在650 nm的波长处测定A;同时以0号管为空白。以对照品溶液浓度与其相对应的A计算线性回归方程, $Y=1.4835X+0.0787$, $r=0.999$ 。另精密量取2.2项下的供试品溶液0.3 mL,同法测定。从线性回归方程计算供试品溶液中蛋白浓度,并乘以稀释倍数,计算,即得(表1,图3)。

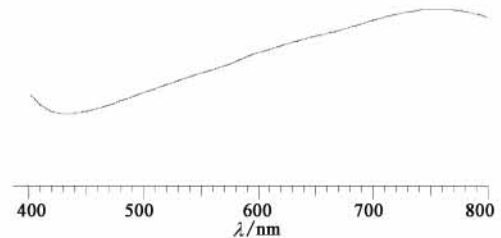


图3 比伐芦定Lorry法II紫外吸收光谱

2.4 茚三酮比色法^[4] 取异亮氨酸对照品适量,精密称定,加水溶解并制成每1 mL含0.862 mg的溶液,精密量取对照品溶液0,0.3,0.4,0.5,0.6,0.7 mL,分别置具塞试管中,各加水至1.0 mL,再分别加磷酸盐缓冲液(pH 6.8)1.0 mL,摇匀,各加入茚三酮试液1.0 mL,摇匀,置100℃水浴中准确反应15 min,置冷水浴5 min,定量转移至100 mL量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,照紫外-可见分光光度法,在567 nm的波长处测定吸光度(A);同时以0号管为空白。以对照品溶液浓度与其相对应的A计算线性回归方程, $Y=1.2738X-0.1602$ ($r=0.9998$)。精密量取2.1项下的供试品溶液10 mL,加入等体积的浓盐酸,水浴回流6 h,水浴蒸干,残渣加水溶解并定量转移至100 mL量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液5 mL,置50 mL量瓶中,加水稀释至

刻度,精密量取 0.5 mL,同法测定总氨基酸含量;另精密量取 2.1 项下的供试品溶液 0.5 mL,同法测定游离氨基酸含量,以总氨基酸含量与游离氨基酸含量之差作为总肽含量(表 1,图 4)。

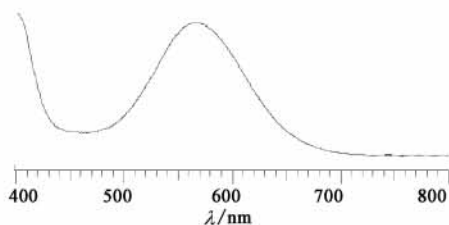


图 4 异亮氨酸茚三酮法紫外吸收光谱

2.5 氨基酸分析仪测定法 为使上述结果有准确的参考标准,取 3 批样品用氨基酸检测仪检测游离氨基酸和水解后总氨基酸的含量,以两者之差作为总肽的含量(表 2)。

表 2 氨基酸含量百分比(101006 批次) %

氨基酸种类	游离氨基酸	水解氨基酸	氨基酸种类	游离氨基酸	水解氨基酸
丙氨酸	0.17	6.15	亮氨酸	0.33	8.12
精氨酸	0.06	4.96	赖氨酸	0.11	4.42
天冬氨酸	0.07	9.07	蛋氨酸	0.23	1.22
胱氨酸	0.06	1.80	苯丙氨酸	0.09	2.90
谷氨酸	0.33	11.9	脯氨酸	0.02	5.69
甘氨酸	0.11	6.23	丝氨酸	0.07	3.81
组氨酸	0.04	1.60	苏氨酸	0.06	3.04
异亮氨酸	0.27	5.32	酪氨酸	0.04	2.53
缬氨酸	0.25	5.59	总和	2.31	84.35

2.6 氨基酸分析仪测定结果(表 2) 批号为 101006 的样品固形物中总肽量为 82.04%,另 2 批次样品(批号为 100912,101003)游离氨基酸含量分别为 3.61%,3.46%,水解后总氨基酸含量分别为 80.21%,82.63%,总肽量分别为 76.60%,79.17%。

3 讨论

3.1 对照品的选择 目前,关于蛋白、肽类的比色方法一般选择以牛血清白蛋白作为对照品,这是造成很多结果偏离实际结果的原因之一。近几年已经有文献报道要求尽量选择与样品成分同质的对照品做含量测定。比伐芦定是一种近年来应用于临床的直接凝血酶抑制剂,于 2000 年批准在美国上市,其有效抗凝成分为水蛭素衍生物片段,是一种由 20 个氨基酸组成的肽类,与相对分子量小于 3 000 的水

蛭仿生酶解小肽成分上吻合并且同样是作为抗凝血制剂使用。因此,选择比伐芦定作为最终的对照品是合理的,从而解决了所有蛋白、肽类比色含量测定均以牛血清白蛋白为对照品而使结果不准确的难题。

结合氨基酸分析仪所测 17 种氨基酸含量,可计算出样品液中氨基酸的平均相对分子质量分别为 131.12,131.18,130.95,故选择相对分子质量为 131.16 的异亮氨酸作为茚三酮比色法中的对照品。

3.2 含量测定方法的选择 双缩脲法操作简便,反应快速但灵敏度很低,对于某些低含量的肽类不能有效检测,并且文献报道双缩脲试剂不与二肽反应^[5],这也是导致含量测定结果较低的原因之一。而且,该法消耗对照品量很大,检测成本增加。

Lorry 比色法 I 所测结果总体与氨基酸分析仪测定结果接近,但重复性不好,数据精密度差,并且反应时间短,有沉淀需要离心,很难做到操作时间上的平行,结果波动性大。

Lorry 比色法 II 所测结果与与氨基酸分析仪测定结果相近,而且结果重复性、精密度均良好,反应彻底,稳定性好。

茚三酮比色法是利用盐酸水解后总氨基酸的含量减去盐酸水解前间接测得样品中总肽含量,由于肽会干扰盐酸水解前游离氨基酸含量的测定,故测量结果比真实值要低,但仍有参考意义。

结合上述分析,2010 年版《中国药典》三部收载的 Lorry 法可以作为水蛭仿生酶解小肽含量的测定方法。

[参考文献]

- [1] 余兰,丁香安. 三氯乙酸沉淀法结合双缩脲比色法测定水蛭提取液中总蛋白含量[J]. 中国药物与临床,2004,4(9):685.
- [2] 中国药典. 二部[S]. 2010. 附录:54.
- [3] 中国药典. 三部[S]. 2010. 附录:34.
- [4] 唐樑,秦明珠. 鳄鱼膏总氨基酸的含量测定[J]. 亚太传统医药,2007,3(7):52.
- [5] 陈国庆,乔玉晶. 双缩脲试剂能和二肽反应吗[J]. 生物学教学,2008,33(12):66.

[责任编辑 蔡仲德]