



胰凝乳蛋白酶原 效价检测方法

一、溶液的配制

1. 底物溶液的制备: 取N-乙酰-L-酪氨酸乙酯 (ATEE) 23.7mg, 置100ml量瓶中, 加磷酸盐缓冲液(pH7.0) 50ml, 温热使溶解, 冷却后再稀释至刻度, 摇匀。冷冻保存, 但不得反复冻融。

2. 胰蛋白酶溶液的制备: 称取胰蛋白酶适量, 用0.001N盐酸制成1mg/ml的溶液。

3. 供试品溶液的制备: 取本品约50mg, 溶于30ml水中, 加入10ml 0.2mol/L磷酸盐缓冲液 (pH7.6) (取磷酸二氢钾27.22g, 加水使溶解成1000ml, 取50ml, 加0.2mol/L氢氧化钠溶液42.4ml, 再加纯水稀释至200ml, 即得。)和0.5ml胰蛋白酶溶液。在25℃条件下放置1小时。加入0.01N盐酸, 使定容至100ml。精密量取此溶液, 加入0.001N盐酸4ml, 作为供试品溶液。

4. 标准品溶液的配制: 精密称取USP标准品或工作标准品适量, 用0.0012mol/l盐酸溶液制成每1ml中含12~16胰凝乳蛋白酶原单位的溶液。

5. 空白溶液: 将0.2ml的0.0012mol/L盐酸溶液和3ml纯水混合, 作为空白溶液。

二、操作步骤

1. 将空白溶液置1cm比色皿中, 于237nm的波长处测定并使读数为0.00, 作为空白对照。再取0.2ml供试品溶液与底物溶液3.0ml, 立即计时并摇匀, 在25℃±1.0℃, 每隔30秒钟读取吸光度, 共5分钟, 吸光度的变化率应恒定, 恒定时间不得少于3分钟。若变化率不能保持恒定, 可调整供试液浓度另行测定。每30秒钟的吸光度变化率应控制在0.008~0.012 (重复该流程至少1次), 以吸光度为纵坐标, 时间为横坐标, 作图, 取在3分钟内呈直线的部分, 按下式计算。

$$P = \frac{A_2 - A_1}{0.0075TW}$$

式中:

P为每1mg胰凝乳蛋白酶原的效价, 单位;

A2为直线上开始的吸光度;



A1为直线上终止的吸光度;

T为A2至 A1读数的时间, 分钟;

W为测定液中含供试品的量, mg;

0.0075为在上述条件下, 吸光度每分钟改变0.0075, 即相当于1个胰凝乳蛋白酶原单位。

2. 同法测定胰凝乳蛋白酶原标准品溶液。(使用胰凝乳蛋白酶原参考标准品确定底物的适用性, 检查分光光度计对测定项目的调节性。)

3. 将胰凝乳蛋白酶原标准品实际测得的效价单位/mg除以标准品标签上标注的效价USP units/mg, 得出标准品的系数。

4. 将供试品测得的效价除以标准品的系数得出供试品实际的效价, USP units/mg。



源叶