

采用固体复合酶测定果糖二磷酸钠含量的方法研究

李薇, 楚莉辉, 劳瑞珍

(广州市药品检验所, 广州 510160)

摘要 目的: 建立固体复合酶活力测定方法及采用固体复合酶测定果糖二磷酸钠(FDP)含量的酶反应方法。方法: 在固体复合酶作用下, 通过测量还原型辅酶I(NADH)在340 nm处吸收度的变化来测定果糖二磷酸的含量。结果: 果糖二磷酸钠在 $0.1 \sim 0.6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内线性关系良好($r = 0.9997$), 注射用果糖二磷酸钠平均回收率为99.3% ($n = 9$); 果糖二磷酸钠注射液平均回收率为99.0% ($n = 9$)。结论: 本法方法简便、准确, 专属性强, 可用于果糖二磷酸的含量测定。

关键词: 果糖二磷酸钠; 固体复合酶; 酶反应方法

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)10-1646-05

Study on determination of sodium fructose diphosphate by solid compound enzyme

LIW ei; CHU Li-hui; LAO Rui-zhen

(Guangzhou Institute for Drug Control Guangzhou 510160 China)

Abstract Objective To establish a method for the determination of enzymatic activity of solid compound enzyme and established a method of enzymatic reaction for the determination of sodium fructose diphosphate(FDP) by solid compound enzyme **Method** The solid compound enzyme was used in the determination of sodium fructose diphosphate by absorption change of NADH at 340 nm. **Result** There was a good linear relationship of sodium fructose diphosphate within the range of $0.1 - 0.6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($r = 0.9997$). The average recovery of sodium fructose diphosphate for injection was 99.3% ($n = 9$). The average recovery of sodium fructose diphosphate injection was 99.0% ($n = 9$). **Conclusion** The method was simple, accurate, specific and suitable for the determination of sodium fructose diphosphate

Key words sodium fructose diphosphate; solid compound enzyme; enzymatic method

果糖二磷酸钠(FDP)在临床上用于治疗心血管疾病, 是急性心肌梗塞、心功能不全、冠心病、休克等症的急救药, 还可作为各类外科手术中的辅助药物, 并对各类肝炎引起的深度黄疸、转氨酶升高及低蛋白血症等有良好的治疗作用^[1,2]。

果糖二磷酸钠的测定方法有酶法^[3]和二苯胺法^[4], 二苯胺法专属性较差, 6-磷酸果糖、果糖均能干扰测定结果; 酶法较二苯胺法专属性好, 但酶法中使用的醛缩酶(ALD)、磷酸丙糖异构酶(TM)和磷酸甘油脱氢酶(GDH)目前国内没有产品, 只能从国外购买。北京泰来羚羊科贸有限公司开发的固体复合酶“怡心力”主要含有醛缩酶(ALD)、磷酸丙糖异构酶(TM)和磷酸甘油脱氢酶(GDH), 本文采用固体复合酶“怡心力”, 建立其酶活力的测定方法以

及果糖二磷酸钠含量测定的方法。

1 仪器与试剂

Cary-100紫外可见分光光度计(美国 Varian)。

D-无水葡萄糖对照品(批号 110833-200302)、果糖对照品(批号 100231-200303)、果糖二磷酸钠对照品(批号 100539-200301, 含量为74.1%)均购于中国药品生物制品检定所; 果糖二磷酸钠样品(注射用果糖二磷酸钠规格为 $5 \text{ g} \cdot \text{瓶}^{-1}$; 果糖二磷酸钠注射液规格为 $100 \text{ mL} : 10 \text{ g}$)由国内厂家提供; 6-磷酸葡萄糖(批号 052k7043)、6-磷酸果糖(批号 043k7005)购于 Sigma公司; 还原型辅酶I(NADH)购于德国 Boehringer Mannheim公司; 固体复合酶由北京泰来羚羊科贸有限公司提

供, 商品名“怡心力”; 其他试剂均为分析纯。

2 实验方法和结果

2.1 试液配制

2.1.1 盐酸三乙醇胺缓冲液 (0.4 mol·L⁻¹, pH 7.6) 取盐酸三乙醇胺 18.6 g 加水 200 mL 溶解, 加乙二胺四乙酸二钠 3.7 g 用 2 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液调节 pH 至 7.6 加水稀释至 250 mL。4 °C 保存, 可稳定保存 1 周。

2.1.2 复合酶溶液 取固体复合酶 0.1 g 用盐酸三乙醇胺缓冲液 (pH 7.6) 溶解并稀释至 10 mL。垂熔漏斗过滤, 4 °C 保存。

2.1.3 还原型辅酶 I (NADH) 溶液 取还原型辅酶 I 6.5 mg 用盐酸三乙醇胺缓冲液溶解并稀释至 50 mL。

2.1.4 空白酶溶液 取固体复合酶 60 mg 用盐酸三乙醇胺缓冲液 (pH 7.6) 溶解并稀释至 20 mL。垂熔漏斗过滤, 4 °C 保存, 2 d 内使用。

2.1.5 测定酶溶液 取空白酶溶液 10 mL, 加还原型辅酶 I 3.0 mg 溶解后 4 °C 保存, 2 d 内使用。

2.2 专属性考察 分别取 D-无水葡萄糖对照品、果糖对照品、6-磷酸葡萄糖、6-磷酸果糖、果糖二磷酸钠对照品适量, 用水溶解并制成每 1 mL 约含 0.4 mg 的溶液, 按含量测定方法项下测定吸收度, 结果仅果糖二磷酸钠溶液的吸收度降低, 其余溶液的吸收度无变化, 表明国产复合酶试剂仅与果糖二磷酸钠反应, 与葡萄糖、果糖、6-磷酸葡萄糖、6-磷酸果糖均无反应。

2.3 还原型辅酶 I (NADH) 的摩尔吸收系数及浓度的确定 果糖二磷酸钠在醛缩酶的作用下, 裂解成 3-磷酸甘油醛和磷酸二羟丙酮 (在磷酸丙糖异构酶作用下二分子可以互变), 3-磷酸甘油醛经脱氢酶氧化等一系列过程, 生成丙酮酸^[5], 这个反应需要 NADH 提供 H⁺ 转化为 NAD, 引起 NADH 的数量变化, NADH 在 340 nm 波长处有特征吸收峰, NAD 在 340 nm 波长处却无这一吸收带, 可以从 NADH 的吸收度变化, 测定果糖二磷酸钠的含量。从默克索引“MERCK INDEX”可查到 NADH 在 340 nm 波长处的摩尔吸收系数为 6290 水分约为 7%~8%, 在固体复合酶活力测定方法的反应条件下, 根据比尔定律, 吸收度 A 与吸光物质的浓度 c 和吸收池光程长 b 的乘积成正比, 即公式 A = εbc, 若样品池测得的吸收度为 1 左右时, NADH 的浓度应配制为约 0.12 mg·mL⁻¹。

2.4 缓冲液的选择 选取盐酸三乙醇胺缓冲液

(0.4 mol·L⁻¹, pH 7.6) 和三羟甲基胺基甲烷 (Tris) 缓冲液 (0.1 mol·L⁻¹, pH 7.6), 分别按固体复合酶活力测定方法测定复合酶活力 (批号 050703), 结果分别为 48.5 μg·min⁻¹·mg⁻¹ 和 50.7 μg·min⁻¹·mg⁻¹, 两者差别不大, 为了与国家药品标准试验条件一致, 选取盐酸三乙醇胺缓冲液测定复合酶活力。

2.5 固体复合酶活力测定方法

取果糖二磷酸钠 0.3 g (按无水物计算), 用水溶解并稀释至 10 mL 制成果糖二磷酸钠溶液。

取石英吸收池 2 只, 1 只加 NADH 溶液 2.99 mL 和果糖二磷酸钠溶液 10 μL 作为样品池; 另 1 只加盐酸三乙醇胺缓冲液 2.99 mL 和果糖二磷酸钠溶液 10 μL 作为空白池, 摇匀, 静置 5 min 照紫外-可见分光光度法 (中国药典 2005 年版二部附录 IV A), 在 340 nm 波长处测定吸收度。向样品池中加入复合酶溶液 40 μL, 在 20~25 °C 立即摇匀并准确记时, 每间隔一定时间 (每 1 min 或每 30 s) 测定吸收度, 以时间为横坐标, 吸收度为纵坐标作图, 取近似直线部分的斜率 (即平均每分钟吸收度的差值 ΔA) 按下式计算复合酶的活力。

$$\text{复合酶活力} = \frac{\Delta A \times 3 \times 406.06 \times 1000}{6.29 \times 10^3 \times 2 \times W}$$

式中: 6.29 × 10³ 为 NADH 的摩尔吸收系数; 3 为反应溶液体积 (mL); 406.06 为果糖二磷酸钠三钠盐的相对分子质量 (C₆H₁₁N₃O₁₂P₂); 1000 为毫克 (mg) 转化为微克 (μg); 2 为果糖二磷酸钠反应系数; W 为加入样品池中的酶溶液毫克数 (mg)。

4 批复合酶的活力测定结果见表 1, 酶活力反应曲线见图 1。

表 1 复合酶活力测定结果
Tab 1 Determination results of enzymatic activity of solid compound enzyme

批号 (Lot No.)	加入酶量 (added amount) /mg	斜率 (slope) /(n=2)	酶活力 (enzymatic activity) /μg·min ⁻¹ ·mg ⁻¹
050602	0.4088	0.1225	29.0
050703	0.4052	0.1809	43.3
050804	0.4040	0.1894	45.4
050905	0.4032	0.1735	41.7

酶活力是指酶催化一定化学反应的能力^[5], 实质上是以酶催化的反应速度来表示, 酶催化的反应速度愈大, 酶的活力就愈高; 速度愈小, 酶的活力就愈小。在进行酶活力测定时, 应该选择反应产物与

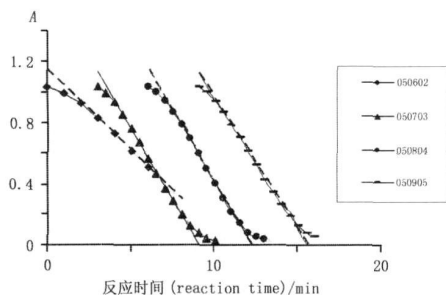


图 1 酶活力的反应曲线图

Fig 1 Reaction curves of enzymatic activity

反应时间呈线性关系的区段, 才能真实地代表酶活力。从图 1 可见, 在上述测定方法的反应条件下, 反应产物(吸收度)与反应时间呈线性关系, 酶反应速度近似恒定, 符合酶活力测定的要求。复合酶活力是指每 1 mg 酶每 1 min 催化果糖二磷酸钠的微克数 ($\mu\text{g} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$), 应不少于 40 μg 。

2.6 含量测定方法

2.6.1 线性关系考察 精密称取果糖二磷酸钠对照品适量, 加水配成 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (按无水物计算) 的对照品溶液, 分别精密量取对照品溶液 1, 2, 3, 4, 5, 6 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加水稀释到刻度, 用 3 个批号 (批号 050703, 050804, 050905) 的复合酶溶液按含量测定方法操作测定吸收度, 将吸收度 (A) 与浓度 (C) 进行线性回归, 3 批酶试剂测得的果糖二磷酸钠线性回归方程分别为:

$$A = -0.003664 + 0.9960C \quad r = 0.9995$$

$$A = 0.004976 + 0.9805C \quad r = 0.9999$$

$$A = 0.007319 + 0.9696C \quad r = 0.9996$$

表 3 注射用果糖二磷酸钠回收率试验测定结果

Tab 3 The results of recovery of FDP for injection

样品 (sample)	取样量 (volume of sample) /mg	加入量 (added) /mg	测得量 (found) /mg	回收率 (recovery) %	平均回收率 (average recovery) %	RSD %
1	0.1367	0.2076	0.3435	99.62	99.58	0.67
2	0.1409	0.2076	0.3490	100.2		
3	0.1263	0.2076	0.3317	98.90		
4	0.1850	0.2076	0.3923	99.85	99.49	0.75
5	0.1988	0.2076	0.4036	98.63		
6	0.1992	0.2076	0.4068	99.99		
7	0.2581	0.2076	0.4644	99.34	98.86	1.0
8	0.2422	0.2076	0.4450	97.68		
9	0.2399	0.2076	0.4466	99.55		

精密量取已知含量的果糖二磷酸钠注射液 (批号 040517) 9 份, 均分为 3 组, 分别置 100 mL 量瓶中, 配成相当于标示量 70%, 100%, 130% 的溶液,

结果表明, 果糖二磷酸钠浓度在 $0.1 \sim 0.6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内与吸收度呈良好线性关系。

2.6.2 精密度试验 精密称取果糖二磷酸钠对照品适量, 加水配成 $0.4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (按无水物计算) 的对照品溶液, 用 4 批固体复合酶溶液 (批号 050602, 050703, 050804, 050905) 按含量测定方法操作重复测定吸收度, RSD ($n = 6$) 分别为 1.43%, 0.849%, 0.693%, 0.319%, 表明精密度良好。

2.6.3 重复性试验 取注射用果糖二磷酸钠和果糖二磷酸钠注射液各 1 批, 精密称定或量取多份, 加水配成 $0.4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (按无水物计算) 的溶液, 按含量测定方法操作测定, 结果见表 2。结果表明重复性良好。

表 2 重复性试验结果

Tab 2 The results of repeatability

剂型 (dosage forms)	批号 (Lot No.)	含量 (contents) %	RSD %
注射用果糖二磷酸钠 (FDP for injection)	20040201	102.03	0.97 ($n = 12$)
果糖二磷酸钠注射液 (FDP injection)	040517	89.4	0.86 ($n = 9$)

2.6.4 回收率试验

精密称取已知含量的注射用果糖二磷酸钠 (批号 20040201) 9 份, 均分为 3 组, 分别置 100 mL 量瓶中, 配成相当于标示量 70%, 100%, 130% 的溶液, 分别精密加入 $14.01 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 果糖二磷酸钠对照品溶液 2 mL, 加水至刻度, 按含量测定方法操作, 计算回收率 ($n = 9$) 为 99.3%, 结果见表 3。

分别精密加入 $13.62 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 果糖二磷酸钠对照品溶液 2 mL, 加水至刻度, 按含量测定方法操作, 计算回收率 ($n = 9$) 为 99.0%, 结果见表 4。

表 4 果糖二磷酸钠注射液回收率试验测定结果

Tab 4 The results of recovery of FDP injection

样品 (sample)	取样量 (volume of sample) /mg	加入量 (added) /mg	测得量 (found) /mg	回收率 (recovery) %	平均回收率 (average recovery) %	RSD %
1	0.1341	0.2018	0.3359	99.98	99.58	0.36
2	0.1341	0.2018	0.3345	99.30		
3	0.1341	0.2018	0.3348	99.45		
4	0.2235	0.2018	0.4222	98.42	98.81	0.98
5	0.2235	0.2018	0.4215	98.10		
6	0.2235	0.2018	0.4252	99.92	98.55	1.22
7	0.3129	0.2018	0.5142	99.73		
8	0.3129	0.2018	0.5094	97.33		
9	0.3129	0.2018	0.5119	98.59		

2.6.5 含量测定

取 6 批样品, 分别精密称定, 加水溶解并制成每 1 mL 约含 0.4 mg(按无水物计算) 的溶液作为供试品溶液。

精密量取盐酸三乙醇胺缓冲液 2 mL, 测定酶溶液 1 mL, 置石英吸收池中; 另精密量取盐酸三乙醇胺缓冲液 2 mL, 空白酶溶液 1 mL 置另一吸收池, 作为空白, 摇匀, 静置 15 min, 照紫外-可见分光光度法(中国药典 2005 年版二部附录 IV A), 在 340 nm 波长处测定吸收度 A_1 。各池再分别精密加入供试品溶液 0.1 mL, 摇匀, 于 20~25 °C 放置 10 min, 在 340 nm 波长处测定, 直至吸收度基本不变, 读取吸收度 A_2 , 求出吸收度差值 ΔA ($\Delta A = A_1 - 1.0333A_2$), 按下式计算, 即得。

$$\text{果糖二磷酸钠}(\%) = \frac{\Delta A}{6.29 \times 10^3 \times 2} \times \frac{3.0 \times 406.06 \times \text{稀释倍数}}{0.1 \times W} \times 100$$

式中: 1.0333 为加入供试品溶液后与未加供试品溶液样品池中溶液的体积比值; 3.0 为加入供试品溶液前样品池中溶液的体积 (mL); 6.29×10^3 为 NADH 的摩尔吸收系数; 2 为果糖二磷酸钠反应系数; 406.06 为果糖二磷酸钠三钠盐的相对分子质量 ($C_6H_{11}Na_3O_{12}P_2$); 0.1 为供试品溶液加入体积 (mL); W 为供试品的取样量 (mg 以无水物计算)。结果见表 5

果糖二磷酸钠注射液(批号 040517)含量测定结果与重复性试验结果相差 3%, 可能与果糖二磷酸钠注射液稳定性差, 容易降解有关, 重复性试验用的是已开封进行了含量测定后的样品, 可能因此导致比含量测定的结果低。

表 5 含量测定结果

Tab 5 The results of contents

样品名称 (name of sample)	批号 (Lot No.)	含量 (content) %
注射用果糖二磷酸钠 (FDP for injection)	20040201	101.4
	20040202	97.4
	20040203	100.5
果糖二磷酸钠注射液 (FDP injection)	040516	92.4
	040517	92.6
	040518	92.7

3 讨论

3.1 固体复合酶活力测定实际是测定酶反应的速度, 为保证测得的是反应的初速度(反应产物与反应时间呈线性关系), 底物浓度应足够大, 把酶完全饱和, 这样酶反应对于底物来说是零级反应, 测得的酶活力才能准确地代表酶的含量。固体复合酶活力测定方法的酶反应条件中, 参与反应的还原型辅酶 I (NADH) 有 $0.5 \mu\text{mol}$ 理论上作为底物的果糖二磷酸钠参与反应数量应不少于 $0.25 \mu\text{mol}$ 固体复合酶参与反应数量为 0.4 mg 按酶活力为 $40 \mu\text{g} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ 、反应时间为 5 min 计算, 需要底物 $80 \mu\text{g}$ 即 $0.2 \mu\text{mol}$ 底物实际配制为 $0.74 \mu\text{mol}$ 为理论值的 3 倍左右, 底物浓度足够完成反应。如果固体复合酶活力过高, 可适当调低复合酶溶液的浓度。酶活力愈大, 表明酶含量愈高, 通过测定酶活力, 可控制固体复合酶的质量。

3.2 含量测定方法中通过测定 NADH 的数量变化来测定底物果糖二磷酸钠的浓度, 为了确保反应完全, 应加入大量的酶和小量的底物。含量测定方法的酶反应条件中, 参与反应的 NADH 有 $0.4 \mu\text{mol}$ 理论上作为底物的果糖二磷酸钠参与反应数量应少于 $0.2 \mu\text{mol}$ 固体复合酶参与反应数量为 3 mg 按

酶活力为 $40 \mu\text{g} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ 计算, 可催化底物 $120 \mu\text{g} \cdot \text{min}^{-1}$, 即 $0.3 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$, 底物实际配制为 $0.1 \mu\text{mol}$ 为理论值的 0.5 倍左右, 底物能够反应完全。如果固体复合酶活力过低, 可适当调高复合酶溶液的浓度。

3.3 含量测定方法中通过 NADH 在 340 nm 的最大吸收波长处的摩尔吸收系数计算果糖二磷酸钠的含量, 紫外分光光度计的波长准确度对测定结果有一定影响, 340 nm 波长与最大吸收波长偏差越大, 两者吸收度差值越大, 在 340 nm 测得的吸收度不能代表为 NADH 的吸收峰值。实验数据表明, 若测得 NADH 的最大吸收波长为 338 nm, 与 340 nm 波长偏差 2 nm, 测得的吸收度差值可达 0.001 左右。

3.4 酶反应生成物氧化型辅酶 I (NAD) 在 340 nm 波长处有较弱吸收, 国产试剂 NAD (纯度 90% 以上) 的 $0.1 \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 溶液吸收度 $A_{340 \text{ nm}}$ 为 0.0035, Sigma 试剂 NDA (纯度 97% 以上) 的 $0.1 \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 溶液吸收度 $A_{340 \text{ nm}}$ 为 0.0025, 约为同浓度 NADH 吸收度的 0.3%, 生成物 NAD 几乎不影响含量测定结果。

3.5 含量测定方法为底物测定法, 而非速度法, 测定环境的温度对酶反应速度有影响, 对底物的总变化量影响不大。实验数据表明, 测定温度高, 达到吸收度基本不变的时间相对缩短, 测定温度低, 反应时间相对延长, 但吸收度差值 ΔA 基本不变。

参考文献

- 1 Markov AK, Oglethepe N. Theapeutic action of fructose - 1, 6 - diphosphate in traumatic shock *World J Surg*, 1983, 7(3): 430
- 2 LILiang-zhu(李良铸), LIMing-ye(李明晔). *The New Technology of Biochemical Drug Preparation (最新生化药物制备技术)*. Beijing(北京): China Medico - Pharmaceutical Science and Technology Publishing House(中国医药科技出版社), 2000. 294
- 3 National Drug Standards(Temporary) [国家药品标准(试行)]. WS - 226(X - 196) - 99
- 4 National Drug Standards(国家药品标准). WS₁ - (X - 062) - 2001Z
- 5 SHEN Tong(沈同), WANG Jing-yan(王镜岩). *Biochemistry(生物化学)*. Zhejiang(浙江): Higher Education Publishing House(高等教育出版社), 1980. 231, 485

(本文于 2009 年 4 月 28 日收到)

《药物残留溶剂分析》一书出版

胡昌勤 编著 978-7-122-03619-3 16开精装 45.00元 2009-01出版

特点: 药品残留溶剂分析是当今药物分析的热点之一, 已经成为药品质量控制的重要组成部分, 是药品检验实验室的常规检测项目。本书在总结实践经验的基础上, 针对药品残留溶剂分析中的常见问题, 从理论和实践两方面探讨解决方案。书中简要介绍了残留溶剂控制标准的沿革和残留溶剂分析方法的沿革; 较系统地介绍了顶空气相色谱法的原理及其在残留溶剂分析中的应用现状; 重点探讨了在药品生产工艺复杂的情况下, 如何实现药品中的残留溶剂进行准确定性问题, 以及残留溶剂分析中的快速定量问题; 总结了药品残留溶剂测定中的各类常见问题, 并提出解决方案; 介绍了如何利用计算机辅助优化药品残留溶剂测定中色谱柱、色谱条件的选择等问题; 最后探讨了如何制定药典各论品种的残留溶剂检测方法。

本书对从事药物分析, 特别是从事药品检验、新药研发等方面的科研工作者有参考和实用价值, 亦可作为大专院校高年级学生和研究生色谱分析、药物分析课的参考书。

(摘自化学工业出版社)