

# 福林酚比色法测定转移因子胶囊中多肽的含量

池宁娟\*, 周虹, 高苏莉, 杨志福\*(第四军医大学第一附属医院药剂科, 西安 710032)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)17-1617-02  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.17.26

**摘要** 目的:建立测定转移因子胶囊中多肽含量的方法。方法:采用福林酚比色法。在样品溶液中加入碱性铜试液和福林酚溶液,反应物在650 nm波长处测定吸光度。结果:多肽检测质量浓度线性范围为4.15~37.35 μg/ml( $r=0.999\ 0$ );平均回收率为100.25%(RSD=1.06%, $n=3$ )。结论:建立的含量测定方法简单易行,结果准确、可靠,可用于转移因子胶囊的质量控制。  
**关键词** 转移因子胶囊;福林酚比色法;多肽;含量测定

**Content Determination of the Polypeptide in Transfer Factor Capsules by Folin-phenol Colorimetry Method**  
CHI Ning-juan, ZHOU Hong, GAO Su-li, YANG Zhi-fu (Dept. of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish the method for the content determination of polypeptide in Transfer factor capsules. METHODS: Folin-phenol colorimetry method was adopted. Alkaline copper and folin-phenol were added into samples, and then absorbance of samples was determined at the detection wavelength of 650 nm. RESULTS: The linear range of polypeptide was 4.15-37.35 μg/ml ( $r=0.999\ 0$ ) with an average recovery of 100.25% (RSD=1.06%,  $n=3$ ). CONCLUSIONS: The method is simple, easy, accurate and reliable, and it is suitable for the quality control of Transfer factor capsules.

**KEYWORDS** Transfer factor capsules; Folin-phenol colorimetry method; Polypeptide; Content determination

转移因子(Transfer factor, TF)是存在于人和动物免疫淋巴细胞内的一种可透析的小分子物质,属于多肽和多核苷酸类。其作为一种细胞免疫增强剂和免疫调节剂,在治疗免疫缺陷、恶性肿瘤、各种感染性疾病等方面均有一定疗效,临床应用普遍<sup>[1]</sup>。TF的含量测定方法常采用多肽或蛋白质的含量测定方法,如双缩脲法,但这类方法具有灵敏度较低、特异性不强、操作烦琐、浊度干扰等不足。福林酚比色法的测定原理为蛋白质或多肽与碱性铜溶液中的Cu反应形成复合物,此复合物加入福林酚试剂后生成蓝色化合物,该蓝色化合物在波长约650 nm处的吸光度与蛋白质或多肽含量成正比<sup>[2-3]</sup>,由此可测定多肽含量。因该法与双缩脲法相比较,具有灵敏度高、特异性强、操作简便、对浊度干扰不敏感等优点,故可用于微量或高度稀释蛋白质、混合组织蛋白质的含量测定<sup>[4]</sup>。笔者采用该法测定转移因子胶囊中多肽的含量,结果表明建立的含量测定方法简单易行,结果准确、可靠,可用于转移因子胶囊的质量控制,现报道如下。

## 1 材料

### 1.1 仪器

UV-2550 紫外-可见分光光度计(日本岛津公司);XW-80A 涡旋混合器(上海精科实业有限公司);BSA224S 分析天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司]。

### 1.2 药品与试剂

血清白蛋白(牛)对照品(中国食品药品检定研究院,批号:140619-201120,纯度:100%);转移因子胶囊(自制,批号:130402、130501、130502,规格:每粒0.22 g,含多肽3 mg);福

\*药师,硕士。研究方向:中药药效物质基础、药物制剂。电话:029-84778303。E-mail:ningjuanchi@163.com

#通信作者:副主任药师,博士。研究方向:中药药效物质基础、临床药学。电话:029-8477810。E-mail:yangtian@fmmu.edu.cn

林酚试剂(美国Sigma公司原产,货号:F9252,北京索莱宝科技有限公司分装);碱性铜溶液按照文献<sup>[2]</sup>配制;水为超纯水。

## 2 方法与结果

### 2.1 溶液的制备及波长的确定

2.1.1 对照品贮备液。取血清白蛋白对照品适量,精密称定为0.024 9 g,置于100 ml量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,即得。

2.1.2 对照品溶液。量取“2.1.1”项下对照品贮备液0.5 ml,置于20 ml具塞刻度试管中,加水补足到1 ml,加碱性铜溶液1 ml,摇匀,快速加入福林酚溶液(福林酚试剂1→16)4 ml,密封,置于涡旋振荡器上振荡,在55℃水浴锅放置5 min后取出,冰水浴至室温,即得。

2.1.3 供试品溶液。取20粒转移因子胶囊内容物混匀,精密称取1.1 g,置于100 ml量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,滤过;取滤液1 ml,置于20 ml具塞刻度试管中,自“加碱性铜溶液1 ml”起,按“2.1.2”项同法操作,作为供试品溶液。

2.1.4 波长的确定。在400~850 nm波长范围内对不同质量浓度对照品溶液和供试品溶液(批号:130402)进行扫描,结果显示二者均在750 nm波长处有最大吸收,而相关文献<sup>[2-4,7]</sup>均采用650 nm为测定波长。故将两波长下标准曲线的吸光度进行比较,结果显示650 nm波长下相关系数为0.999 5,750 nm波长下相关系数为0.998 2,前者线性关系优于后者,故最终选择650 nm为测定波长。光谱图见图1。

### 2.2 线性关系考察

分别精密量取“2.1.1”项下的对照品贮备液0.1、0.3、0.5、0.7、0.9 ml,置于20 ml具塞刻度试管中,自“加水补足到1 ml”起,按“2.1.2”项同法操作。在650 nm波长处测定吸光度,同时以未加对照品管为空白组。以吸光度( $A$ )对质量浓度( $c$ )进行线性回归,得回归方程 $A=0.019\ 4c+0.012\ 6$ ( $r=0.999\ 0$ ),表明多肽检测质量浓度线性范围为4.15~37.35 μg/ml。

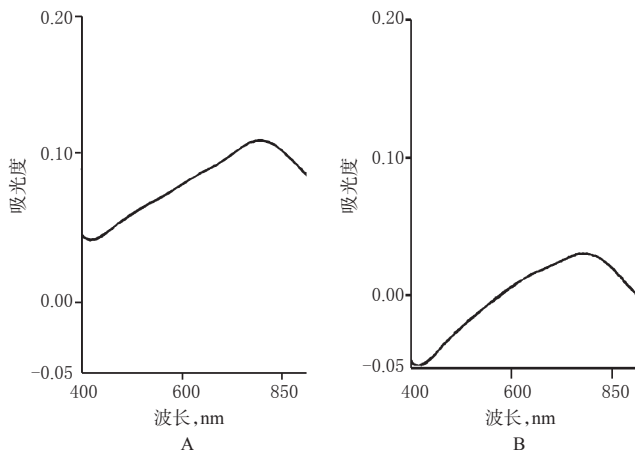


图1 紫外扫描光谱图

A.对照品;B.供试品

Fig 1 UV scan spectrum

A. control; B. sample

### 2.3 精密度试验

取“2.1.2”项下对照品溶液适量,在650 nm波长处测定吸光度,连续测定6次。结果RSD=0.21% (n=6),表明仪器精密度良好。

### 2.4 稳定性试验

取20粒转移因子胶囊内容物(批号:130502)制备成供试品溶液,测定溶液的吸光度,然后每10 min测定1次,共测定6次。结果RSD=0.75% (n=6),表明溶液在1 h内稳定性好。

### 2.5 重复性试验

取40粒转移因子胶囊内容物(批号:130502)混匀,精密称取1.1 g,置于100 ml量瓶中,共取6份,分别加水稀释至刻度,摇匀,滤过;各精密量取续滤液0.5 ml,分别置于20 ml具塞刻度试管中,自“加水补足到1 ml”起,按“2.1.2”项同法操作。在650 nm波长处测定吸光度。结果含量的RSD=0.43% (n=6),表明方法重复性好。

### 2.6 加样回收率试验

取20粒转移因子胶囊内容物(批号:130502)混匀,精密称取1.1 g,置于100 ml量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,滤过;再精密量取续滤液0.5 ml(每1 ml含有150 μg多肽),置于20 ml具塞刻度试管中,共取9份,每3份一组,每组分别精密加入对照品溶液(取对照品贮备液3 ml,置于10 ml量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,即得,质量浓度为74.7 μg/ml)0.8、1.0、1.2 ml,加水补足到2 ml,自“加碱性铜溶液1 ml”起,按“2.1.2”项同法操作。在650 nm波长处测定吸光度,根据测定结果计算平均加样回收率,结果见表1。

### 2.7 样品含量测定

取3个批号的转移因子胶囊各20粒,分别将其内容物混匀,精密称取1.1 g,置于100 ml量瓶中,每个批号称取2份,加水稀释至刻度,摇匀,滤过;分别精密量取续滤液1 ml,置于20 ml具塞刻度试管中,自“加碱性铜溶液1 ml”起,按“2.1.2”项同法操作。在650 nm波长处测定吸光度。经计算得3批样品多肽的平均含量分别为每粒2.873、2.910、3.002 mg。转移因子胶囊质量标准中规定多肽含量限度为标示量90.0%~110.0%,而3批样品含量分别为标示量的95.8%、97.0%、100.1%,均符合规定。

表1 加样回收率试验结果(n=3)

Tab 1 Results of recovery tests (n=3)

样品含量, μg	加入量, μg	测得量, μg	回收率, %	平均回收率, %	RSD, %
75	59.76	133.65	99.18		
75	59.76	135.09	100.25		
75	59.76	136.54	101.32		
75	74.70	151.33	101.09		
75	74.70	152.05	101.59	100.25	1.06
75	74.70	149.16	99.64		
75	89.64	163.60	99.37		
75	89.64	166.48	101.12		
75	89.64	162.52	98.71		

## 3 讨论

目前,蛋白含量测定方法有很多种,不同测定方法其含量测定结果差异很大<sup>[5]</sup>。另由于蛋白质的构成相当复杂,各种蛋白质或多肽中的酪氨酸和色氨酸的含量各不相同,因此在测定时需使用同种蛋白质作标准对照<sup>[3]</sup>。白蛋白是血液中含量最丰富的蛋白质,而牛血清白蛋白是一种受到普遍认可的参考蛋白,常作为蛋白模型进行体外研究,可用于总蛋白或多肽的含量测定<sup>[6]</sup>。福林酚比色法常用于混合组织中多肽的测定,因此,本文选血清白蛋白(牛)作为含量测定的标准对照品。

本试验的最终显色是肽键与碱性溶液中的Cu反应及福林酚试剂被还原这两个不同的步骤所导致,在一定条件下,蓝色深度与蛋白的量成正比。肽键与Cu的反应不是瞬时的,一般在常温下5~10 min反应可接近完全,加热到100 °C或增加碱浓度可加速肽键与Cu的反应,但不改变最终所得色,所以本试验中该步骤为常温下反应<sup>[4]</sup>。福林酚试剂只在酸性条件下稳定,而显色是在碱性条件下进行,故加入福林酚试剂后采用涡旋方式使之充分混匀,使显色完全,否则显色能力下降<sup>[7]</sup>。同时碱性铜溶液和福林酚溶液应临用配制,避免结晶析出或变质导致结果不准。

用福林酚比色法测定3批转移因子胶囊中多肽的含量在标示量范围内,与处方中含量限度相吻合,表明建立的方法可以用于转移因子胶囊中多肽的含量测定。

## 参考文献

- [1] 常建军.转移因子的研究现状及临床应用进展[J].青海大学学报:自然科学版,2007,25(2):31.
- [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:三部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:附录34.
- [3] 邱学伟,杨培民,代龙,等.福林酚比色法测定水蛭仿生酶解小肽的含量[J].医学信息,2011,24(5):2557.
- [4] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al.福林酚试剂法测定蛋白质[J].陈祥娥,译.边玲,校.食品与药品,2011,13(3):147.
- [5] 翁佳妍,吴敏,王爽,等.蛋白质的检测方法简述[J].轻工科技,2012(9):17.
- [6] 郭玲,刘爱国,胡志和.牛血浆中主要蛋白质的研究进展[J].食品科学,2009,30(21):489.
- [7] 黄敬,倪方慧.福林酚法测定软胶囊中肽含量[J].江西医学检验,2004,22(3):260.

(收稿日期:2013-07-09 修回日期:2013-08-08)