

# 国家食品药品监督管理局

## 国家药品标准

WS<sub>1</sub>-(X-073)-2003Z

### 促肝细胞生长素颗粒

Cuganxibaoshengzhangsu Keli

### Hepatocyte Growth-promoting Factor Granules

本品系用促肝细胞生长素溶液与适量蔗糖制成的可溶性颗粒。含多肽应为标示量的90.0%~120.0%。

**【性状】** 本品为淡黄色或浅棕色的可溶颗粒，味甜。

**【鉴别】** 取本品，加水溶解并定量稀释制成每1ml中约含25 $\mu$ g的溶液，照分光光度法（中国药典2000年版二部附录VI A）测定，在（256 $\pm$ 2）nm的波长处有最大吸收。

**【检查】 干燥失重** 取本品，置五氧化二磷干燥器中，在60 $^{\circ}$ C减压干燥至恒重，减失重量不得过2.0%（中国药典2000年版二部附录VIII L）。

**活性** 取本品，照促肝细胞生长素活性测定法（附一）测定，刺激指数不小于4.0。

**其他** 应符合颗粒剂项下有关的各项规定（中国药典2000年版二部附录I N）。

**【含量测定】 对照品溶液的制备** 取牛血清白蛋白对照品，加水溶解制成每1ml中含100 $\mu$ g的溶液。

**供试品溶液的制备** 取装量差异项下的内容物适量，加水溶解制成每1ml中含100 $\mu$ g的溶液。

**测定法** 精密量取对照品溶液与供试品溶液各1ml，分别置具塞试管中，精密加碱性铜试液（甲液：取无水碳酸钠2g、氢氧化钠0.4g与酒石酸钾钠0.02g，加水使溶解成100ml。乙液：取硫酸铜0.5g，加水使溶解成100ml。临用前，取甲液50ml，乙液1ml，混匀即得）5ml，放置10分钟，精密加酚试剂（中国生物制品规程一部33页）0.5ml，摇匀，置35 $^{\circ}$ C水浴中加热30分钟，每隔5分钟振摇一次，取出放冷，照比色法（中国药典2000年版二部附录IV B），在750nm的波长处测定吸收度，计算。

**【类别】** 保肝药。

**【规格】** 5g：50mg

**【贮藏】** 密封，置干燥阴凉处保存。

附：

## 促肝细胞生长素溶液

Cuganxibaoshengzhangsu Rongye

### Hepatocyte Growth-promoting Factor Solution

本品系自健康的乳猪或未哺乳新生牛新鲜肝脏中提取的具有生物活性的多肽水溶液。每 1ml 中含多肽不得少于 10mg。

**【性状】** 本品为微黄色澄明液体。

**【鉴别】** 取本品 1ml，加双缩脲试液（取硫酸铜 1.50g 和酒石酸钾钠 6.0g，加水 500ml 使溶解，边搅拌边加入 10% 氢氧化钠溶液 300ml，用水稀释至 1000ml，混匀）4ml，混匀，室温放置 15 分钟，溶液应显蓝紫色至紫红色。

**【检查】 pH 值** 应为 6.0~7.0（中国药典 2000 年版二部附录 VI H）。

**蛋白质** 取本品 2ml，加 20% 磺基水杨酸 2ml，混匀，不得发生浑浊或沉淀。

**高分子量物质** 照高效液相色谱法（中国药典 2000 年版二部附录 V D）测定。

**色谱条件与系统适用性试验** 用凝胶色谱柱（如 TSK GEL 2000SWxl 7.8mm×300mm，5μm）；流动相为三氟醋酸-乙腈-水（0.05：10：90）；检测波长为 214nm。理论板数按胰岛素峰计算应不得低于 3000。

**对照品溶液的制备** 取胰岛素（分子量 5800）适量，用流动相制成每 1ml 中含 1mg 的溶液。作为对照品溶液。

**供试品溶液的制备** 取本品，加流动相稀释成每 1ml 中含多肽 1mg 的溶液，作为供试品溶液。

**测定法** 取对照品溶液和供试品溶液各 20μl，分别注入液相色谱仪，记录色谱图，按峰面积归一化法计算，小于胰岛素峰保留时间的峰面积之和不得过 6.0%。（供注射用）

**活力测定** 取本品适量，照促肝细胞生长素活性测定法（附一）测定，刺激指数不得小于 4.0。

**异常毒性** 取本品，加氯化钠注射液制成每 1ml 中含多肽 5.0mg 溶液，依法检查（中国药典 2000 年版二部附录 XI C），按静脉注射法给药，应符合规定。（供注射用）

**热原** 取本品，加氯化钠注射液制成每 1ml 中含多肽 5.0mg 溶液，依法检查（中国药典 2000 年版二部附录 XI D），剂量按家兔体重每 1kg 注射 1ml，应符合规定。（供注射用）

**过敏性试验** 取本品适量，加氯化钠注射液制成每 1ml 中含多肽 5.0mg 溶液，作为供试品溶液。取体重 250~350g 健康豚鼠 6 只，间日腹腔注射供试品 0.5ml，连续 3 次，在第三次注射后的第 14 天，自静脉注射本品 1.0ml，注射后 15 分钟内观察动物，均不得出现连续干咳、连续前爪抓鼻、明显耸毛、四肢发软、躺卧、呼吸困难、痉挛、虚脱及死亡现象。连续观察 3 天，动物应健存。（供注射用）

**无菌** 取本品，依法检查（中国药典 2000 年版二部附录 XI H），应符合规定。（供注射用）

**【含量测定】** 取本品适量，加水制成每 1ml 中含多肽 0.15mg 的溶液，作为供试品溶液，精密量取 1.0ml，照福林酚测定法（附二）测定。

**【类别】** 抗肝病药。

**【贮藏】** -18℃ 以下冻存。

**【制剂】** (1) 注射用促肝细胞生长素 (2) 促肝细胞生长素颗粒

## 附一：

### 促肝细胞生长素活性测定法（MTT法）

**试剂的配制** 0.01mol/L 磷酸盐缓冲液（pH7.3） 取氯化钠 8.0g、氯化钾 0.2g、磷酸氢二钠（ $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ） 1.15g 及磷酸二氢钾 0.2g，加超纯水 1000ml 溶解后，高压灭菌。

**RPMI-1640 培养液** 取碳酸氢钠 2.00g 及 RPMI-1640 10.0g 加超纯水约 800ml 溶解后，用 1mol/L 盐酸溶液调节 pH 值至 6.9，加超纯水稀释至 1000ml，过滤除菌。

**10%小牛血清培养液** 取上述 RPMI-1640 培养液 900ml，加已灭活的新生小牛血清 100ml。

**0.25%胰蛋白酶-乙二胺四醋酸二钠消化液** 取 0.25g 胰蛋白酶及 0.02g 乙二胺四醋酸二钠，加 0.01mol/L 磷酸盐缓冲液 100ml 溶解后，用 5.6% 碳酸氢钠调节 pH 值至 7.2，过滤除菌， $-20^\circ\text{C}$  保存。

**噻唑蓝（MTT）溶液** 取 MTT 50mg，加 0.01mol/L 磷酸盐缓冲液 10ml 溶解后，过滤除菌（保存于冷处，使用不超过两周）。

**操作法 供试品溶液的制备** 取供试品适量，用 RPMI-1640 培养液制成每 1ml 中含多肽 100 $\mu\text{g}$  的溶液。

**测定法** 用 10% 小牛血清培养液培养 SMMC-7721 细胞至对数增长期，用 0.25% 胰蛋白酶-乙二胺四醋酸二钠消化液消化，加 10% 小牛血清培养液稀释至每 1ml 中含  $(2.5 \times 10^4) \sim (5 \times 10^4)$  个细胞，将上述细胞悬液在 96 孔细胞培养板上铺板，每孔 100 $\mu\text{l}$ ，其中留 3 孔加 10% 小牛血清培养液 100 $\mu\text{l}$  作为空白对照，置  $37^\circ\text{C}$ ，5% 二氧化碳饱和水汽培养箱中培养 3~4 小时使其贴壁。供试品组，每孔加供试品溶液 100 $\mu\text{l}$ ，每批供试品均做 3 孔，细胞对照组和空白对照组每孔分别加 RPMI-1640 培养液 100 $\mu\text{l}$ ，置  $37^\circ\text{C}$ ，5% 二氧化碳饱和水汽培养箱中培养 48 小时，结束培养前 4 小时取出培养板，吸去培养液，每孔加入 0.01mol/L 磷酸盐缓冲液（pH7.3）洗一次，然后再在每孔中加入上述磷酸盐缓冲液（pH7.3）100 $\mu\text{l}$  和 MTT 溶液 20 $\mu\text{l}$ ，继续培养。培养结束后，吸出培养液，每孔加入 100 $\mu\text{l}$  二甲基亚砜，摇匀，在酶标仪上以 550nm 的波长处分别测定其吸收度 A 值。

$$\text{刺激指数} = \frac{\text{供试品组 3 孔吸收度平均值 } (\bar{A}_T) - \text{空白对照组 3 孔吸收度平均值 } (\bar{A}_0)}{\text{对照组 3 孔吸收度平均值 } (\bar{A}_R) - \text{空白对照组 3 孔吸收度平均值 } (\bar{A}_0)}$$

## 附二：

### 福林酚测定法

**试剂 碱性铜试液** 取氢氧化钠 10g，碳酸钠 50g，加水 400ml 使溶解，作为甲液；取酒石酸钾 0.5g，加水 50ml 使其溶解，另取硫酸铜 0.25g，加水 30ml 使其溶解，将两液混合作为乙液。

临用前，合并甲、乙两液，并加水至 500ml。

**操作法 对照品溶液的制备** 取牛血清白蛋白对照品，加水制成每 1ml 中含 0.3mg 的溶液。

**供试品溶液的制备** 照各品种项下规定的方法制备。

**标准曲线的制备** 精密量取对照品溶液 0.0、0.1、0.3、0.5、0.7、0.9ml，分别置具塞试管中，各加水至 1.0ml，再分别加入碱性铜试液 1.0ml，摇匀，各加入福林酚试液（取福林试液中的贮备液 1→16）4.0ml，立即混匀，置  $55^\circ\text{C}$  水浴中准确反应 5 分钟，置冷水浴 10 分钟，照分光光度法（中国药典 2000 年版二部附录 IV B），在 650nm 的波长处测定吸收度；以 0 号管作为空白。以对照品溶液浓度与相应当吸收度计算回归方程。

**测定法** 精密量取供试品溶液 1.0ml，照标准曲线的制备项下的方法，自“加入碱性铜试液”起，依法测定，从回归方程计算多肽的含量，并乘以稀释倍数，即得。