附件：注射用脑蛋白水解物（I）公示稿

注射用脑蛋白水解物（I）

Zhusheyong Naodanbai Shuijiewu (I)
Cerebroprotein Hydrolysate for Injection (I)

本品系健康猪脑（见附1）经酶水解制得脑蛋白水解物溶液（见附2），加适宜辅料制成的无菌冻干品。每瓶含总氮（N）应为标示量的90.0%~110.0%，含总氨基酸（以氮计）应为总氮的85%~105%，含肽（以氮计）应不低于总氮的15%。

【性状】本品为白色至淡黄色疏松块状物或粉末。

【鉴别】（1）取本品适量，加水溶解并稀释制成每1ml中含氮约6mg的溶液，取2ml，加双缩脲试液（取硫酸铜0.75g和酒石酸钾钠3.0g，加水250ml使溶解，在搅拌下加入10%氢氧化钠溶液150ml，加水至500ml）4ml，应显紫红色。

（2）在含量测定游离氨基酸项下记录的色谱图中，供试品溶液色谱图中各氨基酸峰的保留时间应与相应对照品峰的保留时间一致。

（3）取本品，加水溶解并稀释制成每1ml中含氮约6mg的溶液，作为供试品溶液。另精密称取脑蛋白水解物对照品适量，加水溶解并稀释制成每1ml中含氮约6mg的溶液，作为对照品溶液。照高效液相色谱法（中国药典2025年版四部通则0512）测定。用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂（250mm×4.6mm，5 μ m）；以0.1%三氟醋酸溶液为流动相A；以0.085%三氟醋酸乙腈溶液-0.1%三氟醋酸溶液（80:20）为流动相B，按下表进行梯度洗脱；流速为每分钟0.8ml；检测波长为276nm。

时间（分钟）	流动相A（%）	流动相B（%）
0	100	0
40	50	50
45	0	100
53	0	100
55	100	0
65	100	0

精密量取供试品溶液与对照品溶液各20 μ l，分别注入液相色谱仪，记录色谱图，按中药色谱指纹图谱相似度评价系统计算。供试品溶液的色谱图与对照品溶液色谱图的相似度（扣除色氨酸峰后）不得低于0.9。

【检查】酸碱度 取本品，加水溶解并稀释制成每1ml中含氮约6mg的溶液，依法测定（中国药典2025年版四部通则0631），pH值应为6.9~7.5。

溶液的澄清度与颜色 取本品5瓶，分别加水溶解并稀释制成每1ml中含氮约6mg的溶液，依法检查（中国药典2025年版四部通则0902第一法和通则0901第一法），溶液应澄清无色；如显色，与黄色8号标准比色液比较，均不得更深。

蛋白质 取本品，加水溶解并稀释制成每1ml中含氮约6mg的溶液，取5ml，加20%磺基水杨酸溶液2ml，混匀，溶液不得出现浑浊。

高分子量物质 照分子排阻色谱法（中国药典2025年版四部通则0514）测定。

色谱条件与系统适用性试验 用亲水改性硅胶为填充剂（TSK GEL 2000SWx1，300mm×7.8mm，5μm，或效能相当的色谱柱）；以三氟醋酸-乙腈-水（0.05:40:60）为流动相，流速为每分钟0.7ml；检测波长为214nm。理论板数按核糖核酸酶A峰计算不得低于5000，各相邻峰之间的分离度按峰高与峰谷之比计算均不得小于2.0。

标准曲线的制备 取核糖核酸酶A（分子量13700）、胰岛素（分子量5808）、胸腺肽α1（分子量3108）、生长激素释放抑制因子（分子量1638）各适量，精密称定，分别加流动相溶解并定量稀释制成每1ml中约含1mg的溶液作为分子量标准溶液。精密量取上述分子量标准溶液各20μl，分别注入液相色谱仪，记录色谱图，重复进样5次，其保留时间的相对标准偏差不得大于2.0%。以各峰的保留时间为横坐标，分子量对数为纵坐标进行线性回归，相关系数不得小于0.99。精密量取上述胰岛素分子量标准溶液适量，用流动相定量稀释制成每1ml中约含1μg的溶液，作为灵敏度溶液，精密量取20μl，注入液相色谱仪，记录色谱图，胰岛素峰高的信噪比应不小于10。

测定法 取本品适量，精密称定，加流动相溶解并定量稀释制成每1ml中含氮约1mg的溶液，精密量取20μl注入液相色谱仪，记录色谱图。按面积归一化法计算，供试品溶液色谱图中分子量大于5000道尔顿的高分子量物质不得过1.0%。

特征肽 照高效液相色谱法-质谱法（中国药典2025年版四部通则0512和通则0431）测定。

内标溶液 取内标肽LLGPPMPK（以下简称LLG）对照品适量，加0.1%甲酸溶液-乙腈（97:3）溶解并稀释制成每1ml中约含0.5μg的溶液。

供试品溶液 取本品1瓶，加内标溶液将内容物定量转移至50ml（30mg规格）或100ml（60mg规格）量瓶中，并用内标溶液稀释至刻度，摇匀。

对照品溶液 精密称取TNP、NLD、VTN、NYE对照品各适量，加内标溶液溶解并定量稀释制成S1~S6系列对照品溶液，各组分浓度如下表所示。

浓度（μg/ml） /肽组分名称	S1	S2	S3	S4	S5	S6
TNP	0.6	0.5	0.2	0.1	0.05	0.02
NLD	0.6	0.5	0.2	0.1	0.05	0.02
VTN	0.6	0.5	0.2	0.1	0.05	0.02
NYE	0.3	0.25	0.1	0.05	0.025	0.01
LLG	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5

色谱条件 用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂（Sepax Bio-C18柱，150mm×2.1mm，5μm，或效能相当的色谱柱）；以0.1%甲酸溶液为流动相A，以0.1%甲酸的乙腈溶液为流动相B，按下表进行梯度洗脱；流速为每分钟0.3ml；进样体积5μl。

时间 (分钟)	流动相A (%)	流动相B (%)
1	97	3
5	90	10
15	70	30
16	65	35
17	10	90
18	10	90
20	97	3
23	97	3

质谱条件 采用三重四极杆串联质谱，电喷雾离子源（ESI），正离子多反应监测模式（MRM+），各特征肽及内标肽LLG的监测离子对见下表（必要时，质谱参数可适当调整）。

肽组分名称	母离子 (<i>m/z</i>)	子离子 (<i>m/z</i>)	DP (V)	CE (V)
TNP	429.2	642.3	50	15
NLD	479.3	730.4	80	22.5
VTN	478.8	642.3	30	20
NYE	679.3	458.2	20	25
LLG	430.6	626.4	99	21

系统适用性要求 对照品溶液的出峰顺序依次为 TNP、NLD、VTN、LLG 和 NYE，以各肽组分对照品浓度与内标浓度的比值为横坐标，各肽组分对照品峰面积与内标峰面积的比值为纵坐标，进行线性回归，各肽组分线性拟合相关系数应不低于 0.99。

测定法 精密量取供试品溶液与对照品溶液，分别注入高效液相色谱-质谱联用仪，记录色谱图，按内标法以标准曲线法计算。特征肽的含量应符合表1的规定：

表 1. 特征肽含量限度表

肽组分名称	肽段序列	分子式	各特征肽含量应不得低于	
			30mg 规格 (µg/瓶)	60mg 规格 (µg/瓶)
TNP	TNPWSPR	C ₃₈ H ₅₆ N ₁₂ O ₁₁	2.50	5.00
NLD	NLDIERPT	C ₄₀ H ₆₈ N ₁₂ O ₁₅	3.00	6.00
VTN	VTNPSRPW	C ₄₃ H ₆₅ N ₁₃ O ₁₂	3.25	6.50
NYE	NYEPPTVVPGGDL	C ₆₁ H ₉₂ N ₁₄ O ₂₁	0.85	1.70

活力测定 取本品适量，加完全培养液溶解并稀释制成每1ml中含氮约60 μ g的溶液。照活力测定法（附3）测定，修复率不得低于50%。

水分 取本品，照水分测定法（中国药典2025年版四部通则0832第一法1）测定，含水分不得过3.0%。

异常毒性 取本品，加氯化钠注射液溶解并稀释制成每1ml中含氮约6.0mg的溶液，依法检查（中国药典2025年版四部通则1141），按静脉注射法缓慢给药，应符合规定。

过敏反应 取本品，加氯化钠注射液溶解并稀释制成每1ml中含氮约6.0mg的溶液，依法检查（中国药典2025年版四部通则1147），应符合规定。

细菌内毒素 取本品，依法检查（中国药典2025年版四部通则1143），每1mg中含内毒素的量应小于0.20EU。

降压物质 取本品，依法检查（中国药典2025年版四部通则1145），剂量按猫体重每1kg注射1.0mg（以氮计），应符合规定。

无菌 取本品，用0.1%无菌蛋白胨溶液溶解后，经薄膜过滤法处理，用0.1%无菌蛋白胨溶液分次冲洗（每膜不少于100ml），以金黄色葡萄球菌为阳性对照菌，依法检查（中国药典2025年版四部通则1101），应符合规定。

其他 应符合注射剂项下有关的各项规定（中国药典2025年版四部通则0102）。

【含量测定】总氮 取本品3瓶，加水溶解，合并溶解液并定量稀释至适宜浓度，作为供试品溶液，精密量取适量，依法测定（中国药典2025年版四部通则0704）。

游离氨基酸 取总氮测定项下的供试品溶液，精密量取适量，用水定量稀释至适宜浓度，用氨基酸分析仪或适宜的高效液相色谱仪进行测定。另取各相应的氨基酸对照品适量，精密称定，加水溶解并稀释制成适宜浓度的溶液，作为对照品溶液，同法测定。按外标法或以适宜的氨基酸为内标以峰面积计算各氨基酸含量。游离氨基酸的含量应符合表2的规定：

表2. 游离氨基酸的含量限度

	30mg规格（mg/瓶）	60mg规格（mg/瓶）
门冬氨酸（C ₄ H ₇ NO ₄ ）	12.0~18.0	24.0~36.0
谷氨酸（C ₅ H ₉ NO ₄ ）	16.0~24.0	32.0~48.0
丝氨酸（C ₃ H ₇ NO ₃ ）	1.05~1.95	2.10~3.90
组氨酸（C ₆ H ₉ N ₃ O ₂ ）	5.20~7.80	10.4~15.6
甘氨酸（C ₂ H ₅ NO ₂ ）	6.00~9.00	12.0~18.0
精氨酸（C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂ ）	1.50~5.50	3.00~11.0
苏氨酸（C ₄ H ₉ NO ₃ ）	1.05~1.95	2.10~3.90
丙氨酸（C ₃ H ₇ NO ₂ ）	12.0~18.0	24.0~36.0
脯氨酸（C ₅ H ₉ NO ₂ ）	8.00~12.0	16.0~24.0
缬氨酸（C ₅ H ₁₁ NO ₂ ）	8.00~12.0	16.0~24.0
甲硫氨酸 （C ₅ H ₁₁ NO ₂ S）	1.75~3.25	3.50~6.50
赖氨酸（C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂ ）	24.0~36.0	48.0~72.0

异亮氨酸 (C ₆ H ₁₃ NO ₂)	8.00~12.0	16.0~24.0
亮氨酸(C ₆ H ₁₃ NO ₂)	24.0~36.0	48.0~72.0
苯丙氨酸 (C ₉ H ₁₁ NO ₂)	8.00~12.0	16.0~24.0
色氨酸(C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂)	1.75~3.25	3.50~6.50
总量	140.4~210.7	280.8~421.4

总氨基酸 取总氮测定项下供试品溶液，精密量取适量，置消化管中，加盐酸适量，充氮封口，置110℃水解20小时，放冷，启封，水浴蒸发或吹氮至干，加水使残留物溶解并定量稀释至适宜浓度，作为总氨基酸供试品溶液。用氨基酸分析仪或适宜的高效液相色谱仪进行测定。另取各相应的氨基酸对照品适量，精密称定，加水溶解并定量稀释制成适宜浓度的溶液，作为对照品溶液，同法测定。按外标法或以适宜的氨基酸为内标以峰面积计算各氨基酸含量（以氮计，折算系数见表3，色氨酸除外）。

表3. 各氨基酸与氮折算系数

氨基酸对照品			
氨基酸名称	氮(N)折算系数	氨基酸名称	氮(N)折算系数
门冬氨酸(C ₄ H ₇ NO ₄)	0.1052	脯氨酸(C ₅ H ₉ NO ₂)	0.1217
谷氨酸(C ₅ H ₉ NO ₄)	0.0952	缬氨酸(C ₅ H ₁₁ NO ₂)	0.1196
丝氨酸(C ₃ H ₇ NO ₃)	0.1333	甲硫氨酸(C ₅ H ₁₁ NO ₂ S)	0.0939
组氨酸(C ₆ H ₉ N ₃ O ₂)	0.2708	盐酸赖氨酸(C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂ ·HCl)	0.1534
甘氨酸(C ₂ H ₃ NO ₂)	0.1866	异亮氨酸(C ₆ H ₁₃ NO ₂)	0.1068
精氨酸(C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂)	0.3216	亮氨酸(C ₆ H ₁₃ NO ₂)	0.1068
苏氨酸(C ₄ H ₉ NO ₃)	0.1176	苯丙氨酸(C ₉ H ₁₁ NO ₂)	0.0848
丙氨酸(C ₃ H ₇ NO ₂)	0.1572		

肽 总氨基酸项下测得各氨基酸含量（以氮计，色氨酸除外）分别减去游离氨基酸项下测得各氨基酸含量（以氮计，色氨酸除外），并计算各结果之和在总氮中的量，即得。

【类别】 脑功能改善药。

【规格】 以总氮计（1）30mg （2）60mg

【贮藏】 密闭，在凉暗处保存。

附1:

猪脑

本品系采集自法定兽医检疫部门检疫合格的健康家猪的脑部组织，用于脑蛋白水解物溶液生产。

形状 肉眼观察，猪脑特征明显，鲜品猪脑形态基本完整，呈球状固体外观，血管及沟、回组织纹理清晰可辨，不得有病变、模糊、液化现象。

色泽 肉眼观察，应色泽鲜明，具备新鲜脏器特征，血管鲜红，皮层、灰质髓质呈白色灰夹，不得有全部灰色、无血色或任何发黑、发黄现象。

气味 具新鲜血腥味，无臭味或异味。

纯度 不得夹杂其他脏器组织或异物，3000RPM离心5分钟产生可倾液体不得过固形物重量的10% (冷冻经解冻后)。

新鲜度 取猪脑组织适量，切碎搅匀，精密称取10g (W)，置锥形瓶中，精密加水100ml，不时振摇，浸渍30分钟后离心，精密量取上清液(体积V₃)，作为供试品溶液。预先将盛有10ml吸收液并加有混合指示液 (0.2%甲基红乙醇溶液与0.1%次甲基蓝溶液临用前等体积混合) 5~6滴的锥形瓶置冷凝管下端，并使其下端插入锥形瓶内吸收液 (2%硼酸溶液) 的液面下，精密量取供试品溶液5ml，置蒸馏器反应室内，加1%氧化镁混悬液 (取氧化镁1.0g，加水100ml，振摇成混悬液) 5ml，迅速盖塞，并加水以防漏气，通入蒸气，待蒸气布满蒸馏器内时即关闭蒸气出口管，由冷凝管出现第一滴冷凝水开始计时，蒸馏5分钟即停止，吸收液用硫酸滴定液 (0.005mol/L) 滴定，终点至蓝紫色。同时做空白试验。结果按下式计算，含挥发性盐基氮不得过0.3mg/g。

$$X_1 = (V_1 - V_2) \times 0.1401 \times V_3 / (W \times 5\text{ml})$$

式中 X₁为样品中挥发性盐基氮的含量，mg/g;

V₁为供试品溶液消耗硫酸滴定液 (0.005mol/L) 的体积，ml;

V₂为空白试验消耗硫酸滴定液 (0.005mol/L) 的体积，ml;

V₃为浸渍上清液体积，ml;

0.1401为每1ml硫酸滴定液 (0.005mol/L) 相当于氮的mg数;

W为供试品称样量，g。

包装 离体4小时内收集，置干净食品级塑料袋，每个独立包装不得超过10kg。

贮存 置0℃以下贮存并尽快使用；长期应存放于-10℃以下，贮存期不得超过6个月。

运输 具有贮存条件的运输车。

附2:

脑蛋白水解物溶液 (I)

Naodanbai Shuijiiewu Rongye (I)

Cerebroprotein Hydrolysate (I)

本品系自健康猪脑（见附1）经酶水解得到的溶液。每1ml中含总氮（N）不得低于10.98mg；含总氨基酸（以氮计）应为总氮的85%~105%，含肽（以氮计）应不低于总氮的15%。

【制法与要求】制法 取冻存或新鲜猪脑，洗净，除筋膜，匀浆，制成脑蛋白粉，经酶水解、pH调节、过滤/超滤、沉淀、分离、浓缩、滤过/层析、加热处理、超滤等步骤处理即得（具体以国家药品监督管理部门批准的工艺为准）。

要求（1）本品生产应符合现行版《药品生产质量管理规范》要求；

（2）应有完善的原辅料和中间品质控方法；

（3）生产过程中不得非法添加各种氨基酸等；

（4）生产与贮运过程中应有有效防止变质的条件和措施；

（5）本品为动物来源，应有经验证并批准的有效去除病毒或病毒灭活的方法和措施或工艺。

【性状】本品为浅黄色至黄色澄清液体。

【鉴别】（1）取本品2ml，加双缩脲试液（取硫酸铜0.75g和酒石酸钾钠3.0g，加水250ml使溶解，在搅拌下加入10%氢氧化钠溶液150ml，加水至500ml）4ml，应显紫红色。

（2）在含量测定总氨基酸项下记录的色谱图中，供试品溶液中各氨基酸峰的保留时间应与对照品溶液中相应的氨基酸峰的保留时间一致。

（3）取本品适量，用水稀释制成含氮约6mg的溶液，作为供试品溶液，另精密称取脑蛋白水解物对照品适量，加水溶解并稀释制成每1ml中含氮约6mg的溶液，作为对照品溶液。照高效液相色谱法（中国药典2025年版四部通则0512）测定。以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂（250mm×4.6mm，5μm）；以0.1%三氟醋酸溶液为流动相A；以0.085%三氟醋酸乙腈溶液-0.1%三氟醋酸溶液（80:20）为流动相B，按下表进行梯度洗脱；流速为每分钟0.8ml；检测波长为276nm。

时间（分钟）	流动相A（%）	流动相B（%）
0	100	0
40	50	50
45	0	100
53	0	100
55	100	0
65	100	0

精密量取供试品溶液与对照品溶液各20μl，分别注入液相色谱仪，记录色谱图，按中药色谱指纹图谱相似度评价系统计算，供试品溶液的色谱图与对照品溶液色谱图的相似度（扣除色氨酸峰后）不得低于0.9。

【检查】酸碱度 应为6.5~7.5（中国药典2025年版四部通则0631）。

蛋白质 取本品5ml，加20%磺基水杨酸溶液2ml，混匀，溶液不得出现浑浊。

高分子量物质 照分子排阻色谱法（中国药典2025年版四部通则0514）测定。

色谱条件与系统适用性试验 用亲水改性硅胶为填充剂（TSKGEL 2000SWxl，300mm×7.8mm，5μm，或效能相当的色谱柱）；以三氟醋酸-乙腈-水（0.05:40:60）为流动相，流速为每分钟0.7ml；检测波长为214nm。理论板数按核糖核酸酶A峰计算不低于5000，各相邻峰之间的分离度按峰高与峰谷之比计算均不得小于2.0。

标准曲线的制备 取核糖核酸酶A（分子量13700）、胰岛素（分子量5808）、胸腺肽α1（分子量3108）、生长激素释放抑制因子（分子量1638）各适量，精密称定，分别加流动相溶解并定量稀释制成每1ml中约含1mg的溶液作为分子量标准溶液。精密量取上述分子量标准溶液各20μl，分别注入液相色谱仪，记录色谱图，重复进样5次，其保留时间的相对标准偏差不得大于2.0%。以各峰的保留时间为横坐标，分子量对数为纵坐标进行线性回归，相关系数不得小于0.99。精密量取上述胰岛素分子量标准溶液适量，用流动相定量稀释制成每1ml中约含1μg的溶液，作为灵敏度溶液，精密量取20μl，注入液相色谱仪，记录色谱图，胰岛素峰高的信噪比应不小于10。

测定法 精密量取本品适量，用流动相定量稀释制成每1ml中含氮约1mg的溶液，精密量取20μl注入液相色谱仪，记录色谱图。按面积归一化法计算，供试品溶液色谱图中分子量大于5000道尔顿的高分子量物质的峰面积不得过1.0%。

特征肽 照高效液相色谱-质谱法（中国药典2025年版四部通则0512和通则0431）测定。

内标溶液 取内标肽LLG对照品适量，加0.1%甲酸溶液-乙腈（97:3）溶解并稀释制成每1ml中约含0.5μg的溶液。

供试品溶液 精密量取本品0.24ml至5ml量瓶中，用内标溶液稀释至刻度，摇匀。

对照品溶液 精密称取TNP、NLD、VTN、NYE对照品各适量，加内标溶液溶解并定量稀释制成S1~S6系列对照品溶液，各组分浓度如下表所示。

浓度（μg/ml） /肽组分名称	S1	S2	S3	S4	S5	S6
TNP	0.6	0.5	0.2	0.1	0.05	0.02
NLD	0.6	0.5	0.2	0.1	0.05	0.02
VTN	0.6	0.5	0.2	0.1	0.05	0.02
NYE	0.3	0.25	0.1	0.05	0.025	0.01
LLG	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5

色谱条件 用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂（Sepax Bio-C18，150mm×2.1mm，5μm，或效能相当的色谱柱）；以0.1%甲酸溶液为流动相A，以0.1%甲酸的乙腈溶液为流动相B，按下表进行梯度洗脱；流速为每分钟为0.3ml；进样体积5μl。

时间（分钟）	流动相A（%）	流动相B（%）
1	97	3
5	90	10
15	70	30
16	65	35

17	10	90
18	10	90
20	97	3
23	97	3

质谱条件 采用三重四极杆串联质谱，电喷雾离子源（ESI），正离子多反应监测模式（MRM+），各特征肽及内标肽LLG的监测离子对见下表（必要时，质谱参数可适当调整）：

肽组分名称	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	DP (V)	CE (V)
TNP	429.2	642.3	50	15
NLD	479.3	730.4	80	22.5
VTN	478.8	642.3	30	20
NYE	679.3	458.2	20	25
LLG	430.6	626.4	99	21

系统适用性要求 对照品溶液的出峰顺序依次为 TNP、NLD、VTN、LLG 和 NYE，以各肽组分对照品浓度与内标浓度的比值为横坐标，各肽组分对照品峰面积与内标峰面积的比值为纵坐标，进行线性回归，各肽组分线性拟合相关系数应不低于 0.99。

测定法 精密量取供试品溶液与对照品溶液，分别注入高效液相色谱-质谱联用仪，记录色谱图，按内标法以标准曲线法计算。特征肽的含量应符合表 1 的规定。

表 1. 特征肽含量限度表

肽组分名称	肽段序列	分子式	各特征肽含量应不得低于 ($\mu\text{g/ml}$)
TNP	TNPWSPR	$\text{C}_{38}\text{H}_{56}\text{N}_{12}\text{O}_{11}$	1.00
NLD	NLDIERPT	$\text{C}_{40}\text{H}_{68}\text{N}_{12}\text{O}_{15}$	1.20
VTN	VTNPSRPW	$\text{C}_{43}\text{H}_{65}\text{N}_{13}\text{O}_{12}$	1.30
NYE	NYEPPTVPPGGDL	$\text{C}_{61}\text{H}_{92}\text{N}_{14}\text{O}_{21}$	0.34

活力测定 取本品适量，加完全培养液溶解并稀释制成每1ml中含氮约60 μg 的溶液。照活力测定法（见附3）测定，修复率不得低于50%。

细菌内毒素 取本品，依法检查（中国药典2025年版四部通则1143），每1ml中含内毒素的量应小于1.0EU。

微生物限度 取本品，经薄膜过滤法处理，依法检查（中国药典2025年版四部通则1105），每1ml供试品中需氧菌总数不得过 10^1cfu 。

【含量测定】总氮 精密量取本品适量，定量稀释至适宜浓度，作为供试品溶液，精密量取适量，依法测定（中国药典2025年版四部通则0704）。

游离氨基酸 取总氮测定项下供试品溶液，精密量取适量，用水定量稀释至适宜浓度，用氨基酸分析仪或适宜的高效液相色谱仪进行测定。另取各相应的氨基酸对照品适量，精密称定，加水溶解并定量稀释制成适宜浓度的溶液，作为对照品溶液，同法测定。按外标法或以适宜的氨基酸为内标以峰面积计算各氨基酸含量。游离氨基酸的含量应符合表2的规定。

表2. 游离氨基酸的含量限度

氨基酸	含量限度 (mg/ml)	氨基酸	含量限度 (mg/ml)
门冬氨酸 (C ₄ H ₇ NO ₄)	2.40~3.60	脯氨酸 (C ₅ H ₉ NO ₂)	1.60~2.40
谷氨酸 (C ₅ H ₉ NO ₄)	3.20~4.80	缬氨酸 (C ₅ H ₁₁ NO ₂)	1.60~2.40
丝氨酸 (C ₃ H ₇ NO ₃)	0.21~0.39	甲硫氨酸 (C ₅ H ₁₁ NO ₂ S)	0.35~0.65
组氨酸 (C ₆ H ₉ N ₃ O ₂)	1.04~1.56	赖氨酸 (C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂)	4.80~7.20
甘氨酸 (C ₂ H ₅ NO ₂)	1.20~1.80	异亮氨酸 (C ₆ H ₁₃ NO ₂)	1.60~2.40
精氨酸 (C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂)	0.30~1.10	亮氨酸 (C ₆ H ₁₃ NO ₂)	4.80~7.20
苏氨酸 (C ₄ H ₉ NO ₃)	0.21~0.39	苯丙氨酸 (C ₉ H ₁₁ NO ₂)	1.60~2.40
丙氨酸 (C ₃ H ₇ NO ₂)	2.40~3.60	色氨酸 (C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂)	0.35~0.65
总量	28.08~42.14		

总氨基酸 精密量取总氮项下供试品溶液适量，置消化管中，加盐酸适量，充氮封口，置110℃水解20小时，放冷，启封，水浴蒸发或吹氮至干，加水使残留物溶解并定量稀释至适宜浓度，作为总氨基酸供试品溶液。用氨基酸分析仪或适宜的高效液相色谱仪进行测定。另取各相应的氨基酸对照品适量，精密称定，加水溶解并定量稀释制成适宜浓度的溶液，作为对照品溶液，同法测定。按外标法或以适宜的氨基酸为内标以峰面积计算各氨基酸含量（以氮计，折算系数见表3，色氨酸除外）。

表3. 各氨基酸与氮折算系数

氨基酸对照品			
氨基酸名称	氮(N)折算系数	氨基酸名称	氮(N)折算系数
门冬氨酸(C ₄ H ₇ NO ₄)	0.1052	脯氨酸(C ₅ H ₉ NO ₂)	0.1217
谷氨酸(C ₅ H ₉ NO ₄)	0.0952	缬氨酸(C ₅ H ₁₁ NO ₂)	0.1196
丝氨酸(C ₃ H ₇ NO ₃)	0.1333	甲硫氨酸(C ₅ H ₁₁ NO ₂ S)	0.0939
组氨酸(C ₆ H ₉ N ₃ O ₂)	0.2708	盐酸赖氨酸(C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂ •HCl)	0.1534
甘氨酸(C ₂ H ₅ NO ₂)	0.1866	异亮氨酸(C ₆ H ₁₃ NO ₂)	0.1068
精氨酸(C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂)	0.3216	亮氨酸(C ₆ H ₁₃ NO ₂)	0.1068
苏氨酸(C ₄ H ₉ NO ₃)	0.1176	苯丙氨酸(C ₉ H ₁₁ NO ₂)	0.0848
丙氨酸(C ₃ H ₇ NO ₂)	0.1572		

肽 总氨基酸项下测得各氨基酸含量（以氮计，色氨酸除外）分别减去相应各游离氨基酸含量（以氮计，色氨酸除外），并计算各结果之和在总氮中的量，即得。

【贮藏】 密闭，在低温处保存。

附3:

活力测定法

本法系通过脑蛋白水解物对MPP+损伤的大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞（PC12细胞）具有修复作用，PC12细胞的生长状况因脑蛋白水解物生物学活性的不同而不同，以此检测脑蛋白水解物的活力。

试剂 (1) **RPMI1640培养液** 取RPMI1640培养基粉末1袋（规格为1L），加水溶解并稀释至1000ml，加青霉素10⁵IU和链霉素10⁵IU与碳酸氢钠2.1g，振摇使溶解，混匀，采用验证合格的程序过滤除菌，2~8℃保存。或取市售RPMI1640培养液，加入适量青霉素和链霉素，使终浓度分别为每1ml含100IU，混匀，2~8℃保存。

(2) **完全培养液** 取胎牛血清和马血清各50ml，加RPMI1640培养液至1000ml。

(3) **磷酸盐缓冲液** 取氯化钠8g、氯化钾0.2g、无水磷酸氢二钠1.44g及磷酸二氢钾0.24g，加水溶解并稀释至1000ml，照灭菌法（中国药典2025年版四部通则1421，湿热灭菌法）灭菌。

(4) **0.125%胰蛋白酶-乙二胺四醋酸二钠消化液** 取胰蛋白酶0.125g及乙二胺四醋酸二钠0.02g，加0.01mol/L磷酸盐缓冲液100ml使溶解，用5.6%碳酸氢钠溶液调节pH值至7.2，采用验证合格的程序过滤除菌，-20℃保存。

(5) **3.75mmol/L 1-甲基-4-苯基吡啶离子（MPP+）溶液** 取 MPP+碘（MPP+Iodide）50mg，加磷酸盐缓冲液 8.4 ml 使溶解，采用验证合格的程序过滤除菌，分装至 1.5 ml 离心管中，-70℃避光保存，即得 20 mmol/L 的 MPP+储备液。临用前取 0.4ml 储备液，加入 1.73ml 完全培养液中（可适当调整浓度，使损伤率符合系统适用性的要求），混匀，即得。

(6) **噻唑蓝（MTT）溶液** 取MTT50mg，加磷酸盐缓冲液10ml使溶解，采用验证合格的程序过滤除菌，2~8℃避光保存，两周内使用。

测定法 用完全培养液培养3~10代的PC12细胞（低分化）至对数增长期，用0.125%胰蛋白酶-乙二胺四醋酸二钠消化液消化，加完全培养液稀释至每1ml中含5×10⁴个细胞，将上述细胞混悬液在96孔细胞培养板上铺板，每孔100μl，以完全培养液100μl作为空白对照组，置37℃、5%二氧化碳饱和水汽培养箱中培养24小时。供试品组每孔加供试品溶液100μl，正常细胞组、损伤细胞组和空白对照组每孔分别加完全培养液100μl，每组设3个复孔。置37℃、5%二氧化碳饱和水汽培养箱中培养48小时。供试品组和损伤细胞组每孔加入3.75mmol/L MPP+溶液50μl，剩余孔加入完全培养液50μl，置37℃，5%二氧化碳饱和水汽培养箱中培养20小时。每孔中加入MTT溶液20μl，继续培养4小时。培养结束后，吸出培养液，每孔加入二甲基亚砜100μl，混匀，放入酶标仪，在波长570nm处测定吸光度。按下式计算结果：

$$\text{损伤率} = (\text{Ac} - \text{Ai}) / \text{Ac} \times 100\%$$

$$\text{修复率} = (\text{Ax} - \text{Ai}) / (\text{Ac} - \text{Ai}) \times 100\%$$

式中 Ac为正常细胞组平均吸光度减去空白对照组平均吸光度；

Ai为损伤细胞组平均吸光度减去空白对照组平均吸光度；

Ax为供试品组平均吸光度减去空白对照组平均吸光度。

系统适用性 每组吸光度值的相对标准偏差应不超过 15%。如一孔为异常值而另两孔相对偏差 不超过 15%，该组可删除异常值后取平均值。损伤率为 25%~50%时，试验有效。

提出单位：河北智同生物制药股份有限公司