

## 蚓激酶

### Yinjimei

### Lumbrokinase

本品系人工养殖的赤子爱胜蚓（*Eisenia Foetida Savigny*）中提取制备的一组蛋白水解酶。按干燥品计算，每 1mg 蚓激酶活力不得少于 12000 单位。每 1mg 蛋白蚓激酶活力不得少于 30000 单位。

**【制法要求】** 本品应从经种属鉴定的赤子爱胜蚓中提取，生产过程应符合现行版《药品生产质量管理规范》的要求，应有去除病毒或病毒灭活的方法和有效的措施。

**【性状】** 本品为淡黄色至黄褐色粉末；味腥，有引湿性。

**【鉴别】** （1）取本品适量，加水溶解并稀释制成每 1ml 中约含 0.5mg 的溶液，照紫外-可见分光光度法（中国药典 2020 年版四部通则 0401）测定，在 278nm 的波长处有最大吸收。

（2）取本品适量，加 0.9%氯化钠溶液溶解并稀释制成每 1ml 中约含 10mg 的溶液，作为供试品溶液；用 6 号针头取兔血 1 滴于试管底部，30 分钟后，加供试品溶液 1ml 置试管中，轻轻摇动，血凝块应在 60 分钟内溶解。以 0.9%氯化钠溶液 1ml 为空白，同法操作，血凝块应不溶解。

（3）精密称取本品约 30mg，置 10ml 量瓶中，加 0.9%氯化钠溶液溶解并稀释至刻度，摇匀，作为供试品原液。取供试品原液与非还原型供试品缓冲液按 3：1 混匀（不加热），作为供试品溶液；另取蚓激酶标准品适量，精密称定，加 0.9%氯化钠溶液溶解并稀释制成每 1ml 中约含 5 万单位的溶液，作为标准品原液。取标准品原液同法制备，作为蚓激酶标准品溶液。取供试品溶液、蚓激酶标准品溶液、分子量标准品溶液（应涵盖分子量范围 10KD-50KD，参照说明书配制），照电泳法（中国药典 2020 年版四部通则 0541 第五法，非还原型 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法）试验。

分离胶（12%）的制备 分别量取水 1.6ml、三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液（1.5mol/L，pH8.8）1.3ml、30%丙烯酰胺溶液 2.0ml、纤维蛋白原溶液（可凝蛋白 25mg/ml）100 $\mu$ l、凝血酶溶液（42BP 单位/ml）100 $\mu$ l、10%十二烷基硫酸钠溶液 50 $\mu$ l、10%过硫酸铵溶液 50 $\mu$ l、四甲基乙二胺 2 $\mu$ l，混匀，作为分离胶溶液，立即灌入凝胶膜具内至一定高度，加水封顶，

放至胶液凝固。

浓缩胶的制备 分别量取水 2.9ml、三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液（0.5mol/L, pH6.8）1.25ml、30%丙烯酰胺溶液 0.75ml、10%十二烷基硫酸钠溶液 50 $\mu$ l、10%过硫酸铵溶液 50 $\mu$ l、四甲基乙二胺 5 $\mu$ l，充分混匀，作为浓缩胶溶液，立即灌入去掉水层的分离胶上，插入样品梳，梳子底部与分离胶的前沿距离约 1cm，放至胶液凝固。

电泳 拔出样品梳将电极缓冲液注满电泳槽。样品孔中分别加入供试品溶液、分子量标准品溶液、蚓激酶标准品溶液各 10 $\mu$ l，恒压电泳，初始电压为 80V，进入分离胶时调至 120V，当溴酚蓝迁移至胶底处，停止电泳。

胶片处理 取出胶片，置 2.5%聚乙二醇辛基苯基醚溶液中浸泡 30 分钟，再将胶片移至磷酸盐缓冲液（pH7.4）中，于 37 $^{\circ}$ C 复性 30 分钟，取出胶片，采用考马斯亮蓝法染色 2 小时，用脱色液脱色 12 小时并观察。

结果判断 供试品的电泳谱图中应至少有 5 条亮白条带，分别在 35-42KD 之间有 2 条带，25KD 左右有 2 条带，15KD-25KD 之间有 1 条带。各条带的相对迁移率应与蚓激酶标准品对应条带的相对迁移率一致。

**【检查】 酸碱度** 取本品适量，加水溶解并稀释制成每 1ml 中约含 1mg 的溶液，依法测定（中国药典 2020 年版四部通则 0631），pH 值应为 6.0~8.0。

**溶液的澄清度与颜色** 取本品适量，加水溶解并稀释制成每 1ml 中约含 1mg 的溶液，溶液应澄清（2020 年版四部通则 0902 第一法）；如显色，与黄色 2 号标准比色液（中国药典 2020 年版四部通则 0901 第一法）比较，不得更深。

**干燥失重** 取本品适量，以五氧化二磷为干燥剂，在 60 $^{\circ}$ C 减压干燥至恒重，减失重量不得过 5.0%（中国药典 2020 年版四部通则 0831）。

**微生物限度** 取本品，依法检查（中国药典 2020 年版四部通则 1105 和 1106），应符合规定（中国药典 2020 年版四部通则 1107）。

**【效价测定】 蚓激酶活力**

0.01mol/L 磷酸盐缓冲液（pH7.8） 取磷酸氢二钠 3.58g，加水使溶解并稀释至 1000ml 为 A 液；取磷酸二氢钠（ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ）0.78g，加水使溶解并稀释至 500ml 为 B 液；将 A、B 两液混合调至 pH 值为 7.8。

磷酸盐-氯化钠混合溶液 取 0.01mol/L 磷酸液缓冲液（pH7.8）与 0.9%氯化钠溶液（1：17）混合。

---

**1.5%琼脂糖溶液** 取琼脂糖 1.5g，加磷酸盐-氯化钠混合溶液 100ml 加热溶解。

**纤维蛋白原溶液** 取纤维蛋白原适量，加磷酸盐-氯化钠混合溶液溶解并稀释制成每 1ml 中约含 1.5mg 的可凝蛋白溶液。

**凝血酶溶液** 取凝血酶适量，加 0.9%氯化钠溶液溶解并稀释制成每 1ml 中约含 1BP 单位的溶液。

**蚓激酶标准品溶液** 取蚓激酶标准品适量，精密称定，加 0.9%氯化钠溶液溶解并定量稀释制成每 1ml 中分别含 10000，8000，6000，4000，2000 蚓激酶单位的溶液。

**供试品溶液** 取本品适量，精密称定，加 0.9%氯化钠溶液溶解并定量稀释制成浓度在标准曲线范围内的溶液。

**测定法** 取纤维蛋白原溶液 39ml，置烧杯中，边搅拌边加入 55℃琼脂糖溶液 39ml、凝血酶溶液 3.0ml，立即混匀，快速倒入直径 14cm 塑料培养皿中，水平放置 1 小时，采用内径为 1~3mm 的打孔器打孔。精密量取系列浓度的蚓激酶标准品溶液、供试品溶液各 10μl，分别加入同一平皿样品孔中，并做复孔，加盖，置 37℃恒温箱中反应 18 小时。取出后用卡尺测量溶圈垂直两直径，以蚓激酶标准品单位数的对数为横坐标，垂直两直径乘积的对数为纵坐标，计算回归方程（要求相关系数  $R \geq 0.98$ ），将供试品垂直两直径乘积的对数代入回归方程，以平均值计算每 1mg 供试品的蚓激酶效价。

**蛋白质** 照氮测定法（中国药典 2020 年版四部通则 0704 氮测定法第二法或第三法）测定。

取本品约 20mg，精密称定，测定总氮量（mg）。另精密称取本品约 100mg，置 25ml 量瓶中，加水 15ml 溶解，加 10%钨酸钠溶液 3ml，加 0.33mol/L 硫酸溶液 3ml，用水稀释至刻度，摇匀，静置 30 分钟。以每分钟 10000 的转速离心 30 分钟，取上清液，滤过，弃去初滤液，精密量取续滤液适量，测定非蛋白氮量（mg）。分别计算每 1mg 供试品中总氮量和非蛋白氮量，差值乘以 6.25，即为每 1mg 供试品中的蛋白量（mg）。

**比活力** 本品每 1mg 中蚓激酶活力单位除以蛋白质的量（mg），即得。

**【类别】** 蛋白水解酶。

**【贮藏】** 密封、阴凉干燥处保存。

**【制剂】** （1）蚓激酶肠溶胶囊 （2）蚓激酶肠溶片

---

起草单位：湖北省药品监督检验研究院      复核单位：广东省药品检验所  
主要起草人及联系方式：柯斌斌 郭江红 027-87895873