

ICS 65.020

CCS 点击此处添加 CCS 号

# T/CSTE

## 中国技术经济学会团体标准

T/CSTE 2023—XXXX

### 生物活性肽的鉴别和细胞活性测定

Identification and Cytoactivity Determination of Bioactive Peptides

(征求意见稿)

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

2023 - XX - XX 发布

2023 - XX - XX 实施

中国技术经济学会 发布



版 权 保 护 文 件

版权所有归属于该标准的发布机构，除非有其他规定，否则未经许可，此发行物及其章节不得以其他形式或任何手段进行复制、再版或使用，包括电子版、影印版，或发布在互联网及内部网络等。使用许可可与发布机构获取。

# 目 录

前言 .....	II
1 范围 .....	3
2 规范性引用文件 .....	3
3 术语和定义 .....	3
4 缩略语 .....	3
5 概述 .....	3
6 新建生物活性肽标准品的制备和标定 .....	4
7 生物活性肽供试品的鉴别和细胞活性测定 .....	5
8 结果计算 .....	5
附录 A(资料性)生物活性肽(三肽-1)纯度检测(HPLC 法) .....	8
附录 B(资料性)生物活性肽(三肽-1)分子量和氨基酸序列测定(LC-MS/MS 法) .....	9
附录 C(资料性)生物活性肽(三肽-1)标准品细胞活性标定(细胞增殖法/MTT 比色法) .....	13
附录 D(资料性)生物活性肽(三肽-1)供试品细胞活性测定(细胞增殖法/MTT 比色法) .....	15

## 前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

为了规范生物活性肽的研究、制造与应用，特制定本文件。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由中国技术经济学会提出并归口。

本文件起草单位：珠海金肽生物科技有限公司、珠海亿胜生物制药有限公司、上海昊海生物科技股份有限公司、浙江大学、广州先进技术研究所。

本文件主要起草人：周守山、戴稳平、吴锐、林晓、郑赞顺、周庆玮、夏洁敏、姚之侃、王希。

# 生物活性肽的鉴别和细胞活性测定

## 1 范围

本文件规定了生物活性肽的鉴别和细胞活性测定方法。

本文件适用于具有特定氨基酸序列且具有特定细胞活性的生物活性肽的鉴别和细胞活性测定。

## 2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 38790.1-2020 生物活性肽的功效评价 第一部分：总则

GB/T 39101-2020 多肽抗菌性测定 抑菌圈法

GB/T 39100-2020 多肽抗氧化性测定 DPPH法和ABTS法

T/SHRH 027-2019 体外测试B16细胞黑素合成抑制实验

GB/T 6682-2008 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 16631-2008 高效液相色谱法通则

中华人民共和国药典（2020年版）

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1 生物活性肽 **bioactive peptides**

生物活性肽是对生物体的生命活动具有特定调控作用的肽类化合物。

### 3.2 细胞活性 **cytoactivity**

细胞活性是指生物活性肽对特定靶细胞的增殖、抑制和相关生理活动的调节能力。

### 3.3 细胞活性单位 **cytoactive unit, CU**

本文件中，一个细胞活性单位对应为生物活性肽通过特定方法测定的EC<sub>50</sub>（μg/mL）值。

## 4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

EC<sub>50</sub>: 半数有效浓度（half maximal effective concentration）

HPLC: 高效液相色谱（high performance liquid chromatography）

LC-MS/MS: 液相色谱串联质谱（liquid chromatography--mass spectrometry /mass spectrometry）

## 5 概述

本文件以生物活性肽标准品作为对照品，对生物活性肽供试品进行鉴别和细胞活性测定。生物活性肽标准品应进行必要的分析鉴别，参照《中华人民共和国药典》（2020年版）三部生物制品国家标准物质制备和标定的相关要求，对标准品的纯度、分子量、氨基酸序列、细胞活性等进行分析。

本文件附录根据相关规定，以三肽-1 为实例，从生物活性肽的纯度检测、分子量测定、氨基酸序列测定、新建生物活性肽标准品细胞活性标定和生物活性肽供试品细胞活性测定等方面，对本文件进行了进一步说明。

## 6 新建生物活性肽标准品的制备和标定

### 6.1 新建生物活性肽标准品的要求

- (1) 纯度不低于 95.0%；
- (2) 分子量与理论值一致；
- (3) 氨基酸序列与理论序列一致。

### 6.2 新建生物活性肽标准品的鉴别

#### 6.2.1 纯度确认

参照《中华人民共和国药典》（2020年版）四部通则 0512 高效液相色谱法进行检测，按面积归一化法计算纯度，其结果应符合本文件 6.1（1）要求。

#### 6.2.2 分子量确认

参照 LC-MS/MS 法进行检测，测定新建生物活性肽标准品分子量，其结果应符合本文件 6.1（2）要求。

#### 6.2.3 氨基酸序列确认

参照 LC-MS/MS 法进行检测，测定新建生物活性肽标准品氨基酸序列，其结果应符合本文件 6.1（3）要求。

### 6.3 新建生物活性肽标准品的分装、冻干和包装

根据各种标准物质的要求进行配制、稀释，经质量检验合格后，精确分装，精确度应在 $\pm 1\%$ 以内。分装后立即进行冻干和包装。冻干品的水分含量应不高于3%。

### 6.4 新建生物活性肽标准品的检测项目

根据新建生物活性肽标准品的特性和使用目的，进行分装精度、水分、无菌、生物学活性检测，以及稳定性研究，并根据需要增加其他必要的检测项目。

### 6.5 新建生物活性肽标准品的细胞活性标定

#### 6.5.1 标定方法

不同的生物活性肽具有不同的细胞活性测定方法，应按照相关标准或验证的方法进行相应的细胞活性测定：

(1) 具有促细胞增殖作用的生物活性肽，参照《中华人民共和国药典》（2020年版）四部通则3527 牛碱性成纤维细胞生长因子生物学活性测定法（细胞增殖法 / MTT比色法）和3528人表皮生长因子生物学活性测定法（细胞增殖法 / MTT比色法），进行细胞活性测定；

(2) 具有抑菌作用的生物活性肽，参照GB/T 39101-2020，用抑菌圈法进行细胞活性测定；

(3) 具有抗氧化活性的生物活性肽，参照GB/T 39100-2020，用DPPH法进行细胞活性测定；

(4) 具有黑色素抑制作用的生物活性肽，参照T/SHRH 027-2019，用体外测试B16细胞黑素合成抑制实验进行细胞活性测定；

(5) 具有其他功能的生物活性肽，可选用其他合适的细胞活性测定方法。

根据《中华人民共和国药典》（2020年版）四部通则1431生物检定统计法，以新建生物活性肽标准品溶液浓度的自然对数值为横坐标，以增殖率、抑制率或清除率等为纵坐标，按照量反应平行线测定法建立线性方程（ $R^2 > 0.9500$ ），或四参数回归计算法建立逻辑斯蒂（logistic）方程（ $R^2 > 0.9800$ ），计算出半数有效浓度 $EC_{50}$ （ $\mu\text{g/mL}$ ）。根据 $EC_{50}$ 值计算出新建生物活性肽标准品的细胞活性单位（CU）值。

#### 6.5.2 协作标定

本文件中新建生物活性肽标准品的标定，一般需经至少3个具备相关检测能力的单位协作进行。参加单位应采用统一的设计方案，标定结果须经统计学处理（标定结果至少需取得5次独立的有效结果）。

细胞活性单位（CU）值的确定，一般用各协作单位结果的均值表示，由牵头单位收集各协作单位的标定结果，整理统计，采用适宜的统计学方法进行统计分析并赋值后使用，用 $P_r$ 表示。

#### 6.6 新建生物活性肽标准品稳定性研究

根据标准品性质放置不同温度（一般放置4℃、25℃、37℃、-20℃），不同时间，进行细胞活性的测定，以评估其稳定情况。标准品建立以后，应定期核查其细胞活性是否变化。

#### 6.7 新建生物活性肽标准品的审批

- （1）新建生物活性肽标准品由协作标定牵头单位对协作标定结果进行复核并认可。
- （2）生物活性肽标准品替换批由协作标定牵头单位复核并认可。
- （3）新建生物活性肽标准品经复核并认可后，即为生物活性肽标准品。

#### 6.8 生物活性肽标准品的标签和说明书

- （1）符合规定的合格的生物活性肽标准品由协作标定牵头单位核发标签及说明书。
- （2）生物活性肽标准品标签内容一般包括名称、编号、批号、装量、细胞活性单位（CU）值、用途、存储条件和参与标定的牵头及协作单位等信息。
- （3）生物活性肽标准品应附有说明书。说明书除提供标签所标明的信息外，还应提供生物活性肽标准品的组成和性状、使用方法、稳定性等信息，必要时提供相关参考文献。

#### 6.9 生物活性肽标准品的使用发放和保管

- （1）生物活性肽标准品适用性由使用者根据使用目的自行确认。
- （2）生物活性肽标准品应贮存于适宜的温度、湿度等条件下，其保存条件需定期检查并记录。
- （3）生物活性肽标准品由专人保管和发放。

## 7 生物活性肽供试品的鉴别和细胞活性测定

### 7.1 生物活性肽供试品鉴别

#### 7.1.1 检测

选取与供试品对应的生物活性肽标准品作为对照品，按照《中华人民共和国药典》（2020年版）四部通则0512高效液相色谱法进行检测。

#### 7.1.2 鉴别

结果判定：以保留时间和色谱峰进行鉴别，供试品应与标准品一致。

### 7.2 生物活性肽供试品的细胞活性测定

#### 7.2.1 生物活性肽标准品溶液的制备

取生物活性肽标准品，按说明书复溶后，预稀释至40CU/mL，再稀释到不同倍数，得到不同浓度的生物活性肽标准品溶液。其中预稀释倍数表示为 $D_r$ 。

#### 7.2.2 生物活性肽供试品溶液的制备

取生物活性肽供试品，按标示量复溶后，预稀释至约40CU/mL，再稀释到不同倍数，得到不同浓度的生物活性肽供试品溶液。其中预稀释倍数表示为 $D_s$ 。

#### 7.2.3 生物活性肽供试品活性测定

以生物活性肽标准品为对照，按照相关标准或验证的方法（方法选择同本文件6.5.1），对不同生物活性肽供试品进行细胞活性测定，得出不同稀释倍数对应的增殖率、抑制率或清除率。

根据《中华人民共和国药典》（2020年版）四部通则1431生物检定统计法，分别以生物活性肽标准品和生物活性肽供试品溶液稀释倍数倒数的自然对数值为横坐标，以增殖率、抑制率或清除率等为纵坐标，按照量反应平行线测定法建立线性方程（ $R^2 > 0.9500$ ），或四参数回归计算法建立逻辑斯蒂（logistic）

方程 ( $R^2 > 0.9800$ )。根据方程计算出标准品1CU/ml的稀释倍数 $E_r$ 和供试品相当于标准品1CU/ml的稀释倍数 $E_s$ 。

#### 7.2.4 生物活性肽供试品细胞活性结果计算

按式(1)计算结果:

$$\text{生物活性肽供试品细胞活性单位(CU)值} = P_r \times \frac{D_s \times E_s}{D_r \times E_r} \dots \dots \dots (1)$$

式中:

$P_r$ —为生物活性肽标准品细胞活性单位(CU)值;

$D_s$ —为生物活性肽供试品预稀释倍数;

$D_r$ —为生物活性肽标准品预稀释倍数;

$E_s$ —为生物活性肽供试品相当于生物活性肽标准品1CU/ml的稀释倍数;

$E_r$ —为生物活性肽标准品1CU/ml的稀释倍数。

## 附录说明

本附录根据本文件的相关规定，以三肽-1 为实例，从生物活性肽的纯度检测、分子量测定、氨基酸序列测定、新建生物活性肽标准品细胞活性标定和生物活性肽供试品细胞活性测定等方面，对本文件进行进一步说明。

三肽-1 是具有促细胞增殖活性的生物活性肽，其氨基酸序列为甘氨酸-组氨酸-赖氨酸(Gly-His-Lys)，分子量 340.38Da，CAS 编号为 49557-75-7。本附录根据三肽-1 的促细胞增殖作用特性，选用细胞增殖法/MTT 比色法对其细胞活性进行检测。

### 附录A (资料性)

#### 生物活性肽（三肽-1）的纯度检测（HPLC 法）

##### A.1 试剂及配制

试验用水为 GB/T 6682-2008 规定的一级水。

精密称取三肽-1，配制成溶液，浓度范围（0.05-1.00 mg/mL）。

##### A.1.1 三氟乙酸

色谱纯。

##### A.1.2 乙腈

色谱纯。

##### A.2 仪器

A.2.1 高效液相色谱仪：配有紫外检测器。

A.2.2 分析天平：感量为 0.000 1 g。

A.2.3 涡旋混合器。

A.2.4 超声波清洗器：功率≥500 W。

A.2.5 恒温水浴锅：控温精度  $\pm 1^{\circ}\text{C}$ 。

A.2.6 精密移液器：0.5 $\mu\text{L}$ ~10 $\mu\text{L}$ ，10 $\mu\text{L}$ ~100 $\mu\text{L}$ ，100 $\mu\text{L}$ ~1000 $\mu\text{L}$ 。

##### A.3 色谱条件

以下高效液相色谱操作条件是典型操作参数，可根据不同仪器的特点，对操作参数作适当调整，以获得最佳效果（如：待检测物稳定、特异、丰度高、信噪比优良等）。

###### (1) 色谱条件

流动相：流动相 A：0.1%三氟乙酸-水溶液；流动相 B：0.1%三氟乙酸-乙腈溶液；

流速：1 mL/min；

柱温：25 $^{\circ}\text{C}$ ~30 $^{\circ}\text{C}$ ；

进样量：10 $\mu\text{L}$ ~30 $\mu\text{L}$ ；

色谱柱：十八烷基硅烷键合硅胶柱[粒径 5 $\mu\text{m}$ ，4.6mm×250mm]；

建议梯度洗脱，根据不同仪器和样品优化洗脱条件。

###### (2) 检测条件要求

理论塔板数：>4000；

线性  $R^2$  值：≥0.99；

加标回收率：80%~120%；

精密度：按照《中华人民共和国药典》（2020年版）四部通则 9101 分析方法验证指导原则。外标法时，标准品溶液的色谱峰面积与供试品中对应的色谱峰面积比值不超过 2 倍。

#### A.4 测试

将三肽-1溶液注入液相色谱仪中，以保留时间和色谱峰进行定性，测得三肽-1的色谱峰面积（或峰高）占比。

#### A.5 结果计算

根据面积归一化法计算三肽-1纯度。三肽-1溶液色谱图见图A.1，检测波长214 nm。三肽-1的峰面积（峰高）占比见表A.1，纯度为98.865%。

mV

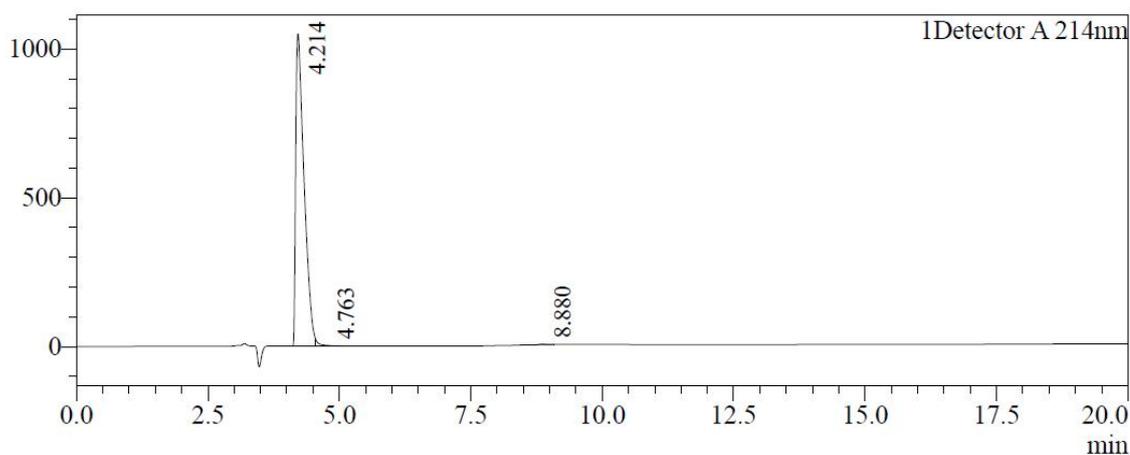


图 A.1 三肽-1溶液色谱图

表 A.1 三肽-1溶液色谱图保留时间、峰面积、峰高

检测波长214 nm

色谱峰	保留时间	峰面积	峰高	峰面积占比%
1	4.214	11583667	1049261	98.865
2	4.763	114127	2588	0.974
3	8.880	18806	1961	0.161
总计		11716600	1053810	100

**附录 B**  
**(资料性)**  
**生物活性肽（三肽-1）分子量和氨基酸序列测定（LC-MS/MS 法）**

**B.1 供试品信息****表 B.1 供试品信息**

名称	三肽-1
性状	类白色粉末
分子量	340.38Da
氨基酸序列	甘氨酸-组氨酸-赖氨酸（Gly-His-Lys）

**B.2 试剂或材料**

试验用水为 GB/T 6682-2008 规定的一级水。

**B.2.1 乙腈**

色谱纯。

**B.2.2 甲酸**

色谱纯。

**B.3 仪器设备**

B.3.1 电喷雾-组合型离子阱 质谱仪。

B.3.2 真空离心浓缩仪。

B.3.3 低温高速离心机：4℃，转速不小于 15 000 r/min。

B.3.4 涡旋振荡仪。

B.3.5 高效液相色谱仪。

**B.4 样品预处理**

称取样品溶解于一级水至浓度为 1mg/mL，使用自填脱盐柱脱盐，于 45℃真空离心浓缩仪中挥干溶剂。

将样品重新溶解于 500μL 样品溶解液（0.1%甲酸，2%乙腈），充分振荡涡旋，13200rpm，4℃离心 10min，上清液转移到上样管中，等待质谱分析。

**B.5 LC-MS/MS 检测****B.5.1 毛细管液相色谱条件：**

- A. 分析柱：十八烷基硅烷键合硅胶柱[粒径 2μm，0.15mm×150mm]；
- B. 流动相 A：0.1%甲酸；
- C. 流动相 B：0.1%甲酸，80%乙腈；
- D. 流速：600nL/min；
- E. 上样量：5μL；
- F. 每个组分分析时间：30min。

表 B.2 梯度洗脱条件

时间	B 相
0	4%
1	8%
20	95%
30	95%

## B.5.2 质谱条件：

表 B.3 质谱条件

一级质谱参数	分辨率：70,000 自动增益控制：3e6 最大离子注入时间：100ms 扫描范围：100 to 1500 m/z
二级质谱参数	分辨率：17,500 自动增益控制：5e4 最大离子注入时间：50ms TopN：20 扫描范围：200 to 2000 m/z

## B.6 数据库检索

B.6.1 质谱原始文件使用 Byonic 检索目标蛋白数据库，检索参数如下：

B.6.2 酶 (enzyme)：unspecific

B.6.3 遗漏酶切位点 (maximum missed cleavages)：2

B.6.4 一级质谱误差 (peptide mass tolerance)：20 ppm

B.6.5 二级质谱误差 (fragment mass tolerance)：0.02 Da

B.6.6 肽段/碎片离子质量数 (mass values)：monoisotopic (单同位素)

B.6.7 显著性阈值 (significance threshold)：0.01

## B.7 实验结果

质谱采集数据生成 raw 文件，使用 Xcalibur 打开，可以看到如下总离子流色谱图，图 B.1。

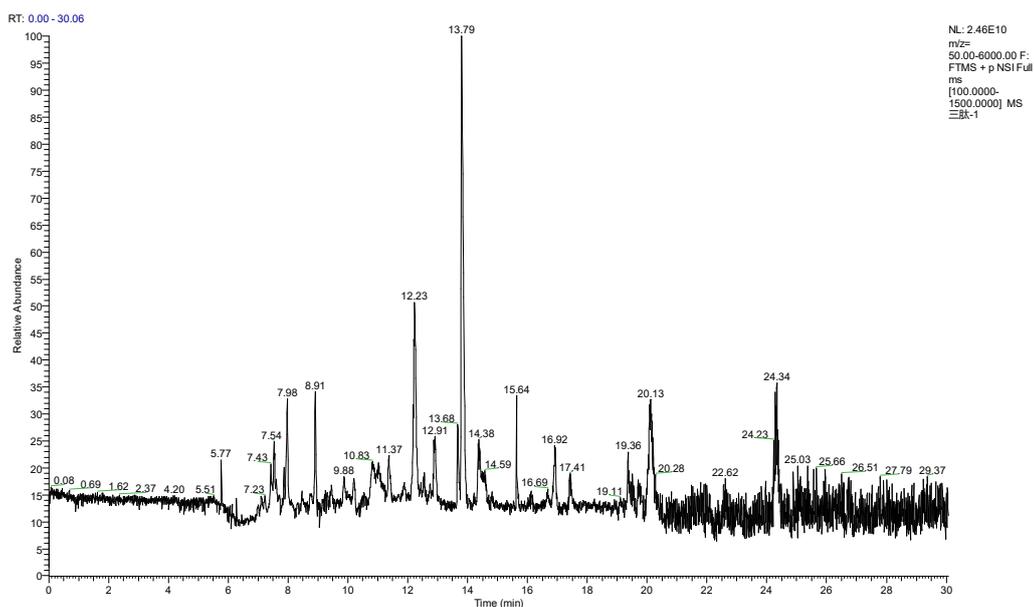


图 B.1 样品三肽-1 的总离子流色谱图

目标肽段的一级质谱图如图 B.2:

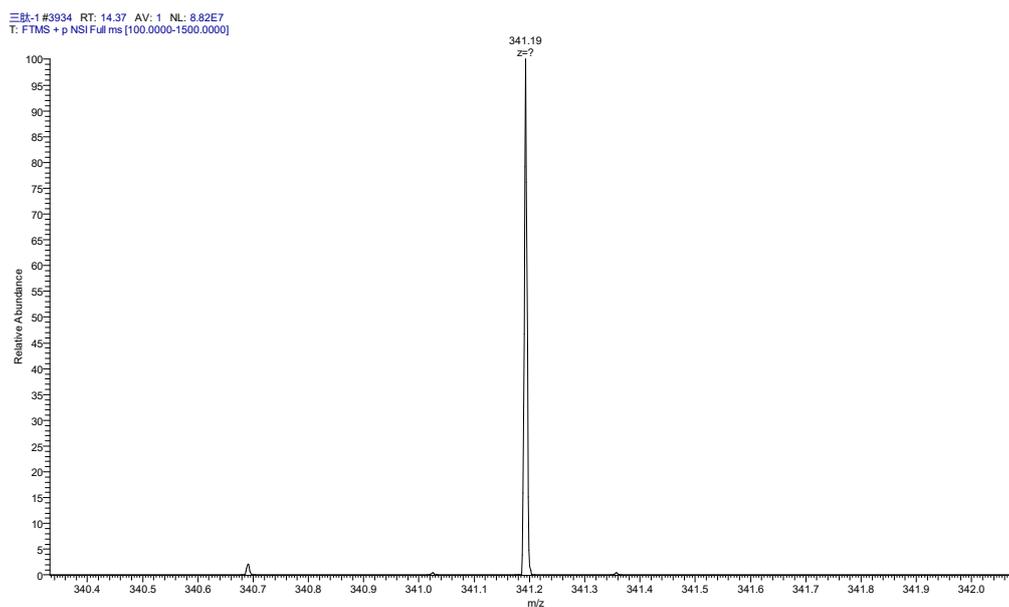


图 B.2 样品三肽-1 的一级质谱图

从一级质谱图上计算肽段的分子量如下:

表 B.4 三肽-1分子量

m/z	z	质量 (Da)	平均质量 (Da)	误差范围 (ppm)
341.19	1	340.19	340.19	-0.46

以样品理论序列建立本地数据库, 以 Byonic 软件进行肽段二级碎裂片段的匹配, 得到肽段的二级质谱图如下:

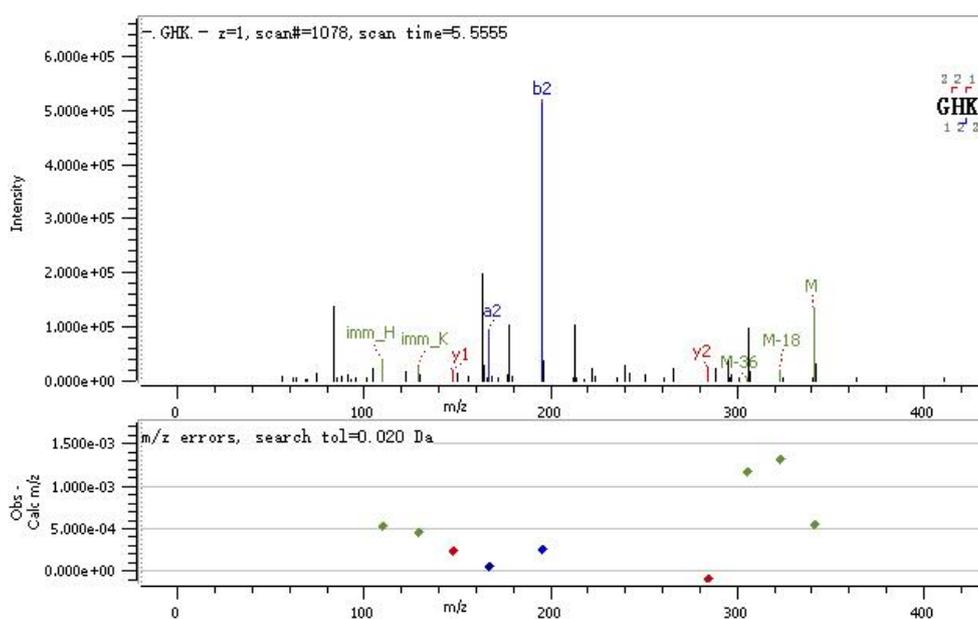


图 B.3 样品三肽-1 的二级质谱图

碎片离子匹配列表如下：

表 B.5 碎片离子匹配表

#	a calc.	b calc.	b-18 calc.	Seq.	y calc.	#
1	30.0338	58.0287	40.0182	G	/	3
2	<b>167.0927</b>	<b>195.0876</b>	177.0771	H	<b>284.1717</b>	2
3	/	/	/	K	<b>147.1128</b>	1

注：加粗标记为匹配上的碎片离子。

## B.8 结论

根据实验结果，可以得出如下结论：

- (1) 从一级质谱图可以计算得到肽段的分子量为 340.19Da，与目标肽段一致。
- (2) 从二级质谱匹配情况可以看出，肽段二级碎裂片段与理论序列的碎片离子匹配度很高，证明肽段序列与理论序列一致。

综上所述，样品中的肽段序列为: Gly-His-Lys。

**附录C**  
**(资料性)**  
**生物活性肽（三肽-1）标准品细胞活性标定（细胞增殖法/MTT比色法）**

**C.1 原理**

本法系依据三肽-1对小鼠胚胎成纤维细胞（BALB/c 3T3细胞）的增殖生长具有刺激作用，BALB/c 3T3细胞的生长状况因三肽-1的生物学活性不同而不同，以此检测三肽-1的细胞活性。

**C.2 试剂****C.2.1 RPMI 1640 培养液**

取RPMI 1640培养基粉末1袋（规格为1 L），溶解并稀释至1000ml，加青霉素 $10^5$  IU和链霉素 $10^5$  IU，再加碳酸氢钠2.1g，溶解后，混匀，经 $0.22\mu\text{m}$ 滤膜除菌过滤， $4^\circ\text{C}$ 保存。

**C.2.2 维持培养液**

量取新生牛血清4mL，加入RPMI 1640培养液至1000mL。

**C.2.3 完全培养液**

量取新生牛血清100mL，加入RPMI 1640培养液至1000mL。

**C.2.4 PBS 溶液**

称取氯化钠8g、氯化钾0.2g、磷酸氢二钠1.44g、磷酸二氢钾0.24g，用盐酸调pH至7.4后，加水溶解并稀释至1000mL，经 $0.22\mu\text{m}$ 滤膜过滤除菌。也可商业购买。

**C.2.5 MTT 溶液**

称取MTT粉末0.10g，加PBS 20mL使溶解，经 $0.22\mu\text{m}$ 滤膜过滤除菌。 $4^\circ\text{C}$ 避光保存。

**C.2.6 DMSO**

分析纯。

**C.3 仪器设备**

C.3.1 精密移液器： $0.5\mu\text{L}\sim 10\mu\text{L}$ ， $10\mu\text{L}\sim 100\mu\text{L}$ ， $100\mu\text{L}\sim 1000\mu\text{L}$ 。

C.3.2 细胞二氧化碳培养箱。

C.3.3 冰箱（ $-20^\circ\text{C}$ ， $4^\circ\text{C}$ ）。

C.3.4 倒置相差显微镜。

C.3.5 酶标仪（ $570\text{nm}$ ）。

C.3.6 通风橱。

C.3.7 超净工作台。

C.3.8 抽滤器。

C.3.9 离心机

**C.4 试验步骤****C.4.1 待标定三肽-1 标准品溶液的制备**

取待标定三肽-1标准品，用维持培养液溶解并定容至1ml，此时三肽-1的浓度为C（ $\mu\text{g/ml}$ ）。根据实验室或文献报告的 $\text{EC}_{50}$ 值，用维持培养液稀释，配制成40倍 $\text{EC}_{50}$ 对应的浓度。在96孔细胞培养板中，做4倍系列稀释，共8个稀释度，每个稀释度做2孔。以上操作在无菌条件下进行。

**C.4.2 测定方法**

BALB/c 3T3细胞株用完全培养液于37℃、5%二氧化碳条件下培养，控制细胞浓度为每1ml含 $1.0 \times 10^5 \sim 5.0 \times 10^5$ 个细胞，传代后24~36小时用于生物学活性测定。弃去培养瓶中的培养液，消化并收集细胞，用完全培养液配成每1ml含 $5.0 \times 10^4 \sim 1.0 \times 10^5$ 个细胞的细胞悬液，接种于96孔细胞培养板中，每孔100 $\mu$ l，于37℃、5%二氧化碳条件下培养。24小时后换成维持培养液，于37℃、5%二氧化碳条件下培养24小时。制备的细胞培养板弃去维持培养液，加入待标定三肽-1溶液，每孔100 $\mu$ l，于37℃、5%二氧化碳条件下培养64~72小时。每孔加入MTT溶液20 $\mu$ l(MTT会和强氧化性或强还原性受试物发生反应，应根据受试物特性判断是否在加入MTT前弃去培养液，并用PBS溶液润洗细胞后再加入含有MTT的培养液)，于37℃、5%二氧化碳条件下培养3~5小时。测定时应添加设置空白孔。以上步骤在无菌条件下进行。弃去细胞培养板中的液体后，向每孔中加入DMSO 100 $\mu$ l，通过镜检确认MTT溶解完全后混匀，放入酶标仪，以630nm为参比波长，在波长570nm处测定吸光度，记录测定结果。

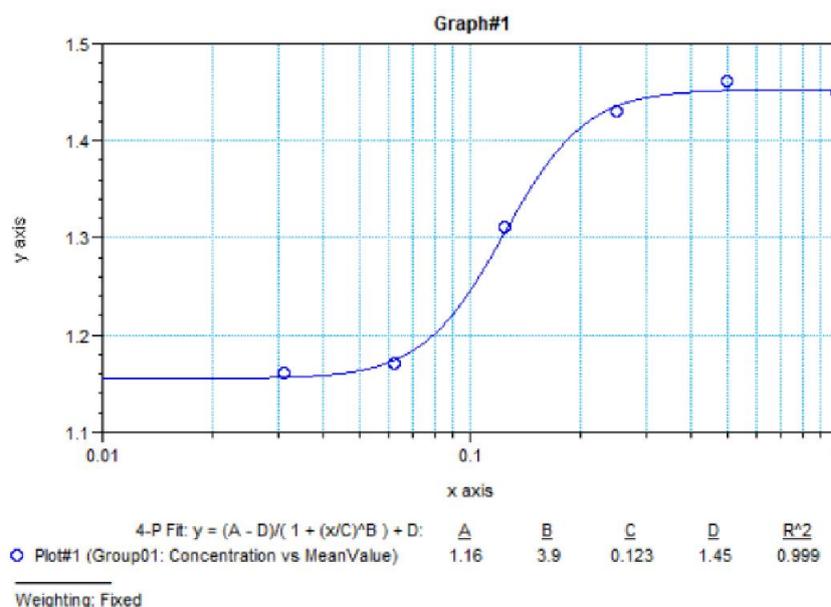
## C.5 结果计算

### C.5.1 细胞活性单位 (CU) 值

采用四参数回归算法，以三肽-1浓度为横坐标，以平均吸光度值为纵坐标，得到三肽-1的促细胞增殖活性回归曲线(图 C.1)，从曲线中计算出三肽-1的半数有效浓度( $EC_{50}$ ) ( $\mu$ g/mL)。

### C.5.2 试验有效标准

回归相关系数 $R^2$ 应不低于0.98。



图C.1 三肽-1的回归曲线(根据SoftMax Pro软件拟合): 图中A为吸光度下限值,代表S型曲线下渐近线; B为曲线斜率; C为半数有效浓度( $EC_{50}$ ) ( $\mu$ g/mL); D为吸光度上限值,代表S型曲线的上渐近线。待标定三肽-1标准品的 $EC_{50}$ 值为0.123 $\mu$ g/mL。

### C.5.2 待标定三肽-1标准品的细胞活性计算公式

根据该 $EC_{50}$ 值计算三肽-1标准品的细胞活性单位(CU)值。

按式(2)计算:

$$P_r = C/EC_{50} \dots \dots \dots (2)$$

式中:  $P_r$ —三肽-1标准品的细胞活性单位(CU)值;

C—待标定三肽-1标准品定容至1mL溶液的浓度( $\mu$ g/mL);

**附录D**  
**(资料性)**  
**生物活性肽（三肽-1）供试品细胞活性测定（细胞增殖法/MTT比色法）**

**D.1 原理**

同附录 C.1。

**D.2 试剂**

同附录 C.2。

**D.3 仪器设备**

同附录 C.3。

**D.4 试验步骤****D.4.1 三肽-1 标准品溶液的制备**

取三肽-1标准品，按说明书复溶后，用维持培养液预稀释至40CU/mL。预稀释倍数为 $D_r$ 。在96孔细胞培养板中，做4倍系列稀释，共8个稀释度，每个稀释度做2孔。以上操作在无菌条件下进行。

**D.4.2 三肽-1 供试品溶液的制备**

取三肽-1 供试品按标示量复溶后，用维持培养液预稀释至约 40CU/mL。预稀释倍数为  $D_s$ 。在 96 孔板细胞培养板中，做 4 倍系列稀释，共 8 个稀释度，每个稀释度做 2 孔。以上操作在无菌条件下进行。

**D.4.3 测定方法**

BALB/c 3T3细胞株用完全培养液于37℃、5%二氧化碳条件下培养，控制细胞浓度为每1ml含 $1.0 \times 10^5 \sim 5.0 \times 10^5$ 个细胞，传代后24~36小时用于生物学活性测定。弃去培养瓶中的培养液，消化并收集细胞，用完全培养液配成每1ml含 $5.0 \times 10^4 \sim 1.0 \times 10^5$ 个细胞的细胞悬液，接种于96孔细胞培养板中，每孔100 μl，于37℃、5%二氧化碳条件下培养。24小时后换成维持培养液，于37℃、5%二氧化碳条件下培养24小时。制备的细胞培养板弃去维持培养液，分别加入三肽-1标准品溶液和供试品溶液，每孔100μl，于37℃、5%二氧化碳条件下培养64~72小时。每孔加入MTT溶液20μl（MTT会和强氧化性或强还原性受试物发生反应，应根据受试物特性判断是否在加入MTT前弃去培养液，并用PBS溶液润洗细胞后再加入含有MTT的培养液），于37℃、5% 二氧化碳条件下培养3~5小时。测定时应添加设置空白孔。以上步骤在无菌条件下进行。弃去细胞培养板中的液体后，向每孔中加入DMSO 100μl，通过镜检确认MTT溶解完全后混匀，放入酶标仪，以630nm为参比波长，在波长570nm处测定吸光度，记录测定结果。

**D.5 结果计算**

试验数据采用计算机程序或四参数回归算法进行处理，得到三肽-1标准品1CU/ml的稀释倍数 $E_r$ 和三肽-1供试品相当于标准品1CU/ml的稀释倍数 $E_s$ 。按照以下公式计算结果：

$$\text{三肽-1 供试品细胞活性单位 (CU) 值} = P_r \times \frac{D_s \times E_s}{D_r \times E_r} \dots \dots \dots (3)$$

式(3)中：

- $P_r$ —为三肽-1标准品细胞活性单位（CU）值；
- $D_s$ —为三肽-1供试品预稀释倍数；
- $D_r$ —为三肽-1标准品预稀释倍数；
- $E_s$ —为三肽-1供试品相当于标准品1CU/ml的稀释倍数；
- $E_r$ —为三肽-1标准品1CU/ml的稀释倍数。