

硫酸鱼精蛋白生物测定标准研究^{*}

郭玉东, 吴彬^{**}, 胡宇驰, 曹春然, 孙媛媛, 左泽平, 李丽, 高阳

(北京市药品检验所, 北京 102206)

摘要 目的: 建立肝素结合力-滴定法, 测定硫酸鱼精蛋白生物活性, 用于替代现行药典标准的兔全血法测定方法。**方法:** 分析国内外硫酸鱼精蛋白生物活性测定法的研究进展, 在本试验室开展肝素结合力-滴定法测定生物活性研究, 通过方法学研究, 并与兔全血法进行一致性考察, 确定该方法在本试验室开展的可行性。**结果:** 本试验室建立了肝素结合力-滴定法测定硫酸鱼精蛋白生物活性的方法, 该方法重复性和中间精密良好, 并与兔全血法测定结果具有较好的一致性。**结论:** 肝素结合力-滴定法测定硫酸鱼精蛋白生物活性, 采用仪器测定, 避免人为判定终点造成的误差, 方法操作简单, 客观性更强, 测定结果更准确, 测定效率更高, 并与兔全血法测定结果一致性良好, 可作为兔全血法的替代方法。

关键词: 硫酸鱼精蛋白; 抗肝素药; 肝素结合力-滴定法; 兔全血测定法; 替代方法; 方法学考察; 标准研究

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2017)08-1541-07

doi: 10.16155/j.0254-1793.2017.08.28

Study on the standard of biological assay of protamine sulfate^{*}

GUO Yu-dong, WU Bin^{**}, HU Yu-chi, CAO Cun-ran, SUN Yuan-yuan,
ZUO Ze-ping, LI Li, GAO Yang

(Beijing Institute for Drug Control, Beijing 102206, China)

Abstract Objective: The establishment of heparin binding-titration method to determine the biological activity of protamine sulfate, and to determine the method of the rabbit blood test by replacing the current Pharmacopoeia standard. **Methods:** The domestic and overseas research progress of the determination of the bioactivity of protamine sulfate was studied, and to bioactivity of heparin binding-titration method was studied in this laboratory. Through a methodological study, together with a conformance investigation with rabbit blood method, the feasibility of this method in the lab is determined. **Results:** The method of biological activity of protamine sulfate was established by heparin binding-titration in our lab, the repeatability and precision of the method was good, and the results were consistent with those in the rabbit whole blood method. **Conclusion:** the determination of biological activity of protamine sulfate titration of heparin binding force by using instrument measurement to avoid errors caused by man-made judgment is simple, more objective and more accurate, and its efficiency is higher, and the results were in good agreement with the rabbit whole blood method. The method be used as an alternative method of

* 药典标准提高课题(课题号 279)

** 通信作者 Tel:(010)52779681; E-mail: wubin@bidc.org.cn

第一作者 Tel:(010)52779671; E-mail: guoyudong23@126.com

rabbit whole blood. **Keywords:** protamine sulfate; anti-heparin medicine; heparin binding-titration; rabbit whole blood method; replacement; methodology study; standard research

硫酸鱼精蛋白作为一种抗肝素药应用于临床,用于治疗肝素注射过量所引起的出血;亦可用于体外循环、血液透析应用肝素结束时中和体内残存的肝素。由于硫酸鱼精蛋白尚具有轻度抗凝血酶原激酶作用,因而临床一般不用于对抗非肝素所致抗凝作用^[1]。目前,临床中手术抗凝使用肝素较为普遍,硫酸鱼精蛋白是唯一能够拮抗肝素抗凝活性的药物^[2],因此手术中使用了大量肝素的病人在术后使用硫酸鱼精蛋白就是必须的选择^[3-4]。硫酸鱼精蛋白的制剂是临床中不可或缺的药品。中国药典(ChP)、美国药典(USP)、英国药典(BP)、欧洲药典(EP)、日本药局方(JP)对硫酸鱼精蛋白均有收录。

虽然硫酸鱼精蛋白的提取来源不尽相同,但其效价均以可中和肝素的效价单位数表示。硫酸鱼精蛋白的效价测定中其生物测定法均采用测定硫酸鱼精蛋白中和肝素所致延长全血/血浆凝结时间的程度,以检测其效价的方法^[5]。由于各国开始收载硫酸鱼精蛋白的情况不尽相同,硫酸鱼精蛋白的效价测定方法在开始收载时存在较大差异,然后逐渐趋于一致,从复杂的生物检定方法逐渐变为理化方法。USP10版在1955年出版时使用的是羊血浆法,之后到USP34版一直是羊血浆法;USP35版变更为肝素结合力-滴定法,至USP38版开始采用液相色谱方法^[6],但还保留肝素结合力-滴定法。BP1963年版开始收载为血浆法,至BP1980年版开始为肝素结合力-滴定法^[7];JP14收载牛全血法,JP16开始为肝素结合力-滴定法^[8];ChP1977年版收载兔全血法,1985年版增加猪/兔血浆法,至2015年版没有进行方法的更新^[9]。

由于使用全血或血浆测定效价,需要制备血液或血浆,用肉眼观察终点,操作步骤多,时间长,器材复杂,结果判断客观性不强的问题;另外,试验中用到实验动物家兔,取血过程烦琐并且会对动物造成致命的伤害,从动物福利及伦理方面考虑也有必要研究有效的替代方法。

肝素结合力-滴定法测定硫酸鱼精蛋白效价,由于不再使用血液或血浆,体系相对简单,同时吸光度的变化采用仪器进行测定^[10],使方法的客观性更强,误差变小。BP1980年版即采用肝素结合力-滴

定法测定,但直到2010年后USP、JP、EP才全部由全血或血浆法变更为肝素结合力-滴定法测定,历经30年的验证和反复论证,说明肝素结合力-滴定法是可行的。

从ChP的发展来看,在收载新鲜兔全血法和猪/兔血浆法后,多年以来方法没有更新。从各国药典现行版本比较来看,ChP中硫酸鱼精蛋白效价测定的方法已经明显落伍,应进行更加准确、高效的新方法研究,尽早替换烦琐、误差大的新鲜兔全血法和猪/兔血浆法。因此进行肝素结合力-滴定法测定硫酸鱼精蛋白的效价测定方法学研究,对推进我国硫酸鱼精蛋白效价测定方法进步是非常必要的。

1 实验材料

1.1 实验动物

普通级日本大耳白家兔,许可证号SCXK(京)2006-0009,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供。

1.2 实验试剂

硫酸鱼精蛋白原料,批号YY150501、YY150502,北京悦康凯悦制药有限公司;硫酸鱼精蛋白注射液,批号09150704、09150705、09150706,北京悦康凯悦制药有限公司;肝素钠标准品,规格197 IU·mg⁻¹,批号150509-200912,中国食品药品检定研究院;灭菌注射用水,批号1510163202,石家庄四药有限公司。

1.3 实验仪器

TU-1901紫外可见分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司;SpectraMax M5酶标仪,Molecular Devices公司;移液枪(1000~100 μL, 200~20 μL, 20~2 μL),Eppendorf公司。

2 实验方法

2.1 试验条件确认

2.1.1 测定波长选择 滴定法测定硫酸鱼精蛋白与肝素结合力效价,采用硫酸鱼精蛋白与肝素形成复合物,复合物沉淀致溶液吸光度增大。当溶液的吸光度值陡然增加的点,就是硫酸鱼精蛋白的效价,USP滴定方法中规定滴定波长为可见光区的任意波长,未进行严格规定,JP规定滴定波长为500 nm,本实验室考察400、450、500、550、600 nm共5个波长,确定最佳波长。

2.1.2 供试品溶液设定 浓度对比 USP、BP 和 JP 滴定方法中供试品溶液的浓度规定,对供试品溶液浓度的规定基本相同,原料均设定为 0.15、0.10 和 0.05 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,制剂为 0.15 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,考察以上浓度在本试验的可行性。

2.1.3 肝素标准品溶液设定 浓度对比 USP、BP 和 JP 滴定方法中标准品溶液的浓度规定,发现对标准品溶液浓度的规定有所不同,USP 规定为 80~120 $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$,JP 规定为 20 $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$,在本实验室考察肝素标准品溶液浓度。

2.1.4 供试品配制溶液稳定性考察 3 种浓度的待测液在室温下的放置,考察放置 4、8 h 的滴定终点与 0 h 的滴定终点有无显著性差异,以确定测定时间。

2.2 方法学考察

2.2.1 重复性考察 3 批硫酸鱼精蛋白注射液各取 3 份,使用灭菌注射用水配制成 0.15 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的供试品溶液,采用肝素标准品溶液(用灭菌注射用水配制成 100 $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$)滴定 2 次,得到 6 个滴定终点结果,计算 6 个结果的平均值为 1 次效价测定值。每批样品在 1 d 内重复测定 6 个效价值,计算 6 个效价测定值的平均值和标准偏差,计算 RSD。2 批硫酸鱼精

蛋白原料各取 3 份,分别配制成 0.15、0.10、0.05 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 供试品溶液,采用肝素标准品溶液滴定 2 次,得到 18 个滴定终点结果,计算 18 个结果的平均值为一次效价测定值。每批样品在 1 d 内重复测定 6 个效价值,计算 6 个效价测定值的平均值和标准偏差,计算 RSD。

2.2.2 中间精密度考察 分别考察 3 批硫酸鱼精蛋白注射液和 2 批硫酸鱼精蛋白原料,连续 3 d,2 个试验人员使用酶标仪和紫外分光光度计测定生物效价,考察该方法的稳定性。

2.2.3 一致性考察 将 3 批硫酸鱼精蛋白注射液和 2 批硫酸鱼精蛋白原料分别采用兔全血法和肝素结合力-滴定法测定生物效价,考察 2 种方法测定结果的一致性。

3 实验结果与讨论

3.1 试验条件考察结果

3.1.1 测定波长 经本实验室对波长进行考察,各测定波长对生物效价测定结果没有影响(表 1)。USP 滴定方法中规定滴定波长为可见光区的任意波长,未进行严格规定,JP 规定滴定波长为 500 nm。考虑方法与国际一致性,因此将测定波长定为 500 nm。

表 1 测定波长对滴定终点的影响

Tab. 1 The effect of measuring wavelengths on titration end point

样品质量浓度 (mass concentration of sample) / ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	编号 (number)	滴定终点时 100 $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 肝素标准溶液加入量 (The amount of heparin standard solution (100 $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$) added at the end of titration) / μL				
		400 nm	450 nm	500 nm	550 nm	600 nm
0.15	1	460	460	460	460	460
	2	460	460	460	460	460
0.10	1	320	320	320	320	320
	2	320	320	320	320	320
0.05	1	155	155	155	155	155
	2	155	155	155	155	155

3.1.2 供试品溶液浓度 当供试品溶液质量浓度在 0.15 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,滴定终点的吸光度 A 在 0.6~0.8 之间(表 2),吸光度较之前基线的跃变差异 ΔA 大致在 0.2~0.3,考虑到分光光度计测定值最佳范围在 0.3~0.7 之间,故确定 0.15 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 为最佳的供试品溶液浓度。为减少误差,在 0.15 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 质量浓度下,再选择 0.10 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 0.05 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 进行不同浓度的滴定测定,通过不同浓度的测定值平均值来保证测定的准确性是必要的。从实验结果来看,0.10 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 0.05 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的滴定终点吸光度和跃变值仪器也能够较好反应。

本方法测定有时会有误差,为保证测定结果的准确性,每个样品应配制 3 份供试品溶液,每份供试品溶液滴定 2 次,以多次滴定得到的平均值为测定结果。如果样品是原料,则每份供试品溶液应配制成 3 个浓度,以 3 份供试品溶液、3 个浓度的滴定终点的平均值为测定结果。如果样品是制剂,因在原料中已经进行过效价测定,配制 1 个浓度即可,以 3 份供试品溶液的平均值为测定结果^[11]。

原料测定进行 3 个浓度跃变差异 ΔA 滴定,制剂测定进行 1 个浓度的滴定,从各国药典的规定来看也是如此。

表 2 硫酸鱼精蛋白不同浓度滴定终点吸光度

Tab. 2 The absorbance of titration end point of different concentrations of protamine

样品质量浓度 (mass concentration of sample) / (mg · mL ⁻¹)	编号 (number)	终点吸光度值 / 跃变差值 (end point absorbance/jump difference)				
		400 nm	450 nm	500 nm	550 nm	600 nm
0.15	1	1.062/ 0.363	0.869/ 0.330	0.749/ 0.295	0.640/ 0.244	0.554/ 0.205
		1.184/ 0.447	0.974/ 0.369	0.808/ 0.290	0.684/ 0.236	0.582/ 0.194
	2	1.056/ 0.366	0.888/ 0.32	0.756/ 0.274	0.651/ 0.238	0.563/ 0.194
		1.001/ 0.300	0.828/ 0.248	0.692/ 0.199	0.580/ 0.158	0.591/ 0.223
0.10	1	0.229/ 0.020	0.173/ 0.020	0.143/ 0.013	0.118/ 0.009	0.102/ 0.006
		0.429/ 0.231	0.334/ 0.167	0.270/ 0.127	0.226/ 0.097	0.191/ 0.072
	2	0.229/ 0.020	0.173/ 0.020	0.143/ 0.013	0.118/ 0.009	0.102/ 0.006
		0.429/ 0.231	0.334/ 0.167	0.270/ 0.127	0.226/ 0.097	0.191/ 0.072

注 (note): 跃变差值是指滴定终点与前面基线吸光度的差异值 (The jump difference is the difference between the titration end point and the absorbance at the previous baseline)

3.1.3 标准品溶液的浓度 滴定时, 每一步滴定加入的肝素量决定了测定结果的离散程度, 肝素加入量大则滴定的次数少而结果的离散度大 (如 116.6、133.3、150.0), 也就是操作简便而误差大。反之, 肝素加入量少则测定步骤多而误差相对小。因此, 肝素的加入量是试验中控制误差的一个关键因素。

肝素的加入量与肝素浓度和肝素加入体积有关, 浓度准确性与体积的准确性非常重要。在同等肝素加入量的情况下, 浓度高的肝素溶液加入体积小, 到滴定终点时整个溶液的体积变化小, 因此在加入体积可控的情况下宜配制高浓度的肝素溶液使用。通过对比各国药典规定浓度^[12], 并结合本试验室结果综合考虑, 如果加样器具经过严格校准能够保证加样体积准确 (10~30 μL 之间), 肝素标准品溶液浓度在 80~120 U · mL⁻¹ 较为合适。

3.1.4 供试品溶液稳定性 对 3 种浓度的供试品溶液在室温下的放置时间进行考察, 结果见表 3。0.15 mg · mL⁻¹ 供试品溶液, 室温下放置 4、8 h 的滴定终点

表 3 硫酸鱼精蛋白供试品溶液稳定性考察

Tab. 3 The investigation of stability of protamine sulfate test solution

样品质量浓度 (mass concentration sample) / (mg · mL ⁻¹)	编号 (number)	配制后放置不同时间测定结果 (determination results of different time after preparation) / (U · mg ⁻¹)			
		0 h	4 h	8 h	成对比较 <i>t</i> 检验 <i>P</i> 值 (<i>P</i> value of paired comparison <i>t</i> test)
0.15	1-1	160.0	153.3	166.7	0~4 h: 0.289 7
	1-2	160.0	153.3	160.0	
	2-1	153.3	153.3	153.3	
	2-2	153.3	153.3	153.3	
	3-1	160.0	160.0	153.3	0~8 h: 0.688 4
	3-2	160.0	160.0	153.3	
	$\bar{X} \pm s$	157.8 ± 3.5	155.5 ± 3.5	156.7 ± 5.6	
	$\bar{X} \pm s$	157.8 ± 3.5	155.5 ± 3.5	156.7 ± 5.6	
0.10	1-1	160.0	155.0	160.0	0~4 h: 0.289 7
	1-2	160.0	155.0	155.0	
	2-1	160.0	160.0	155.0	
	2-2	160.0	160.0	155.0	
	3-1	155.0	155.0	155.0	0~8 h: 0.094 0
	3-2	155.0	155.0	155.0	
	$\bar{X} \pm s$	158.3 ± 2.6	156.7 ± 2.6	155.8 ± 2.0	
	$\bar{X} \pm s$	158.3 ± 2.6	156.7 ± 2.6	155.8 ± 2.0	
0.05	1-1	160.0	155.0	155.0	0~4 h: 0.999 9
	1-2	155.0	155.0	145.0	
	2-1	155.0	160.0	155.0	
	2-2	160.0	160.0	155.0	
	3-1	155.0	155.0	150.0	0~8 h: 0.033 5
	3-2	155.0	155.0	150.0	
	$\bar{X} \pm s$	156.7 ± 2.6	156.7 ± 2.6	151.7 ± 4.1	
	$\bar{X} \pm s$	156.7 ± 2.6	156.7 ± 2.6	151.7 ± 4.1	

与0 h的滴定终点没有显著性差异,说明0.15 mg·mL⁻¹供试品溶液在室温下放置8 h不会对测定结果产生显著影响。但0.10 mg·mL⁻¹和0.05 mg·mL⁻¹的供试品溶液在4 h后与0 h测定结果没有显著性差异,而放置8 h后略有降低,其中0.05 mg·mL⁻¹浓度8 h测定结果与0 h测定结果存在显著差异,说明0.10 mg·mL⁻¹和0.05 mg·mL⁻¹的供试品溶液应尽快测定。

从表3可见,配制好的0.15、0.10和0.05 mg·mL⁻¹的供试品溶液在室温下放置4 h内较为稳定,放置8 h时部分浓度的滴定终点略有降低,为保证测定结果的准确性,供试品溶液应现用现配,最好在4 h内完成测定。

3.2 方法学考察

3.2.1 重复性考察 硫酸鱼精蛋白3批制剂及2批原料在1 d内重复测定6次,测定结果见表4。由表中可以看出原料和制剂的测定结果重复性良好,RSD均小于5%,表明该方法重复性较好。

表4 肝素结合力-滴定法测定硫酸鱼精蛋白效价重复性考察结果

Tab. 4 The repeated examination results of protamine sulfate determined by heparin binding-titration

样品批号 (sample lot)	测定结果 (determination results) / (U·mg ⁻¹)						$\bar{X} \pm s$ / (U·mg ⁻¹)	RSD/ %
	1	2	3	4	5	6		
09150704	133.3	133.3	133.3	132.1	133.3	133.3	133.1 ± 0.5	0.37
09150705	133.3	133.3	130.0	132.2	131.1	131.1	131.8 ± 1.3	1.0
09150706	132.3	133.1	136.7	133.3	133.3	132.2	133.5 ± 1.6	1.2
YY150501	155.8	148.9	157.6	156.1	167.0	161.4	157.8 ± 6.1	3.8
YY150502	148.9	139.6	134.7	141.0	150.9	149.2	144.1 ± 6.5	4.5

3.2.2 中间精密度考察 不同测定日期,每批样品由同一实验人员采用同一台酶标仪连续测定3 d,测定效价见表5。由表5可以看出连续测定3 d,3批制剂和2批原料效价测定结果之间没有显著差异,说明肝素结合力-滴定法测定硫酸鱼精蛋白效价无日间差异,方法可行。

每批样品分别由2个人员采用相同的仪器进行滴定,测定效价值见表5。对表6中各批测定得到的结果分别进行成对比较 t 检验, P 值为0.861,未见显

著性差异。测定结果的差异均小于5%,符合各国药典对本法测定RSD不得大于5%的规定。可见人员之间的测定结果没有显著差异,说明不同人员在经过严格培训后,对测定结果没有显著影响。

表5 肝素结合力-滴定法测定硫酸鱼精蛋白效价日间差异考察

Tab. 5 The day differences results of protamine sulfate determination by heparin binding-titration

样品批号 (sample lot)	测定结果 (determination results) / (U·mg ⁻¹)					RSD/%
	1	2	3	$\bar{X} \pm s$		
09150704	133.3	133.3	133.3	133.3 ± 0.0		0.0
09150705	133.3	130.0	132.2	131.8 ± 1.7		1.27
09150706	133.1	136.7	133.3	134.4 ± 2.0		1.51
YY150501	148.9	157.6	156.1	154.2 ± 4.7		3.02
YY150502	139.6	134.7	136.3	136.9 ± 2.5		1.83

表6 不同人员对肝素结合力-滴定法测定硫酸鱼精蛋白效价影响考察

Tab. 6 The effect of different personnel on the determination of protamine sulfate tite by heparin binding-titration

样品批号 (sample lot)	测定结果 (determination results) / (U·mg ⁻¹)	
	人员 (personnel) 1	人员 (personnel) 2
09150704	133.3	133.3
09150705	133.3	131.2
09150706	132.1	131.1
YY150501	155.2	155.8
YY150502	153.0	148.9

每批样品分别采用2台TU-1901紫外可见分光光度计和2台SpectraMax M5酶标仪进行滴定,测定得到的效价值见表7。对表7中各批测定得到的结果分别进行成对比较 t 检验,每2个仪器之间采用成对比较 t 检验,得到6个比较结果 P 值,分别为0.989、0.951、0.908、0.939、0.914、0.866,可见每台仪器与其他3台仪器的测定结果之间没有显著差异,说明使用不同的酶标仪和紫外仪,对测定结果没有显著影响。

表 7 不同仪器对肝素结合力-滴定法测定硫酸鱼精蛋白效价影响考察 ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$)

Tab.7 The effect of different instrument to determination protamine sulfate by heparin binding-titration

样品批号 (sample lot)	分光光度计 1 (spectrophotometer 1)	分光光度计 2 (spectrophotometer 2)	酶标仪 1 (microplatereader 1)	酶标仪 2 (microplatereader 2)
09150704	132.2	132.2	133.3	131.1
09150705	133.3	136.7	133.3	132.3
09150706	134.2	133.3	132.3	131.4
YY150501	156.9	155.2	155.8	161.1
YY150502	153.0	151.7	157.4	148.9

3.2.3 一致性考察 将方法学研究样品,同时用兔全血法进行测定,得到结果见表 8。将表 8 中的数据进行转换,计算每批次 6 次测定结果的平均值,测定结果除以同批次的平均值转化为百分率数据,得到表 9 数据。

表 8 肝素结合力-滴定法与兔全血法测定结果比较表

Tab. 8 The comparison of measurement results by heparin binding-titration method and rabbit whole blood method

样品批号 (sample lot)	肝素结合力－滴定法 测定结果 (determination results of binding－titration method)/ (U · mg ^{－1})				全血法测 定结果 (determination results of rabbit whole blood)/ (U · mg ^{－1})		－ X ± s/ (U · mg ^{－1})
	1	2	3	4	1	2	
09070404	132.2	132.2	133.3	131.1	136	138	133.8 ± 2.7
09070405	133.3	136.7	133.3	132.3	129	137	133.6 ± 3.0
09070406	134.2	133.3	132.3	131.4	136	143	135.0 ± 4.2
YY150501	156.9	155.2	155.8	161.1	148	147	154.0 ± 5.0
YY150502	153.0	151.7	157.4	148.9	146	154	151.8 ± 4.2

表 9 肝素结合力-滴定法与兔全血法测定结果
比较转化数据表

Tab. 9 The transformed data of measurement results by heparin binding-titration method and rabbit whole blood method

样品批号 (sample lot)	肝素结合力-滴定法转化数据 (transform data of binding-titration method) /%				兔全血法转化数据 (transform data of rabbit whole blood) /%	
	1	2	3	4	1	2
09070404	98.8	98.8	99.6	98.0	101.6	103.1
09070405	99.8	102.3	99.8	99.0	96.6	102.5
09070406	99.4	98.7	98.0	97.3	100.7	105.9
YY150501	101.9	100.8	101.2	104.6	96.1	95.5
YY150502	100.8	99.9	103.7	98.1	96.2	101.4

将肝素结合力-滴定法的测定结果和兔全血法测定结果的转换后数据输入 SPSS 统计软件,进行方差分析。

滴定法测定结果的 RSD 为 0.43%,数据范围为 97.3%~104.6%;而全血法的 RSD 为 1.1%,数据范围为 95.5%~105.9%,说明兔全血法测定结果的误差大,约为滴定法的 3~4 倍。

从方差分析来看,2 种方法之间未见显著性差异, $P > 0.05$,说明肝素结合力-滴定法与兔全血法测定结果的一致性较好。但组内平均方差远远大于组间平均方差,方法内的差异大于方法间的差异^[13-14],说明 2 种方法不是等效的,兔全血法的误差远远大于肝素结合力-滴定法,可认为肝素结合力-滴定法优于兔全血法。

4 结论

由上述结果可以看出,肝素结合力-滴定法测得效价重复性较好,不同仪器、人员、测定日期测得效价无差异,并与兔全血测得效价一致性较好,且误差小于兔全血法,因此肝素结合力-滴定法具备替代兔全血法条件,后期本实验室会联合其他机构进行实验室间的方法学考察,进一步考察该方法的适用性。

目前各国药典收录的最新的硫酸鱼精蛋白生物活性测定法为液相色谱法,由于液相色谱法测定需要硫酸鱼精蛋白标准品,目前我国还没有该标准品,因此该方法还不太适应我国国情,而肝素结合力-滴定法测定硫酸鱼精蛋白生物活性广泛被各国药典采用,并且该方法在本实验的很好的验证,其操作简单,重复性良好,实验误差小,便于推广应用,可考虑纳入 ChP 2015 的修订本以替代 ChP 2015 年版收录的兔全血法。

为保证肝素结合力-滴定法测得效价的准确

性,试验过程使用的量瓶、移液管和加样枪等均需检定,以保证加样体积的准确性。并且一次试验配制标准品溶液和供试品溶液体积应足量,避免多次配制引入误差。滴定中应保证滴加标准品溶液后反应完全,每次滴加肝素标准品溶液后建议摇匀,30 s 再进行吸光度测定,尤其在吸光度开始显著增加时需待吸光度稳定后再读数。

建议在滴定前进行预试:预实验可增加每次滴定液加入体积,如1次滴加50 μ L,可以快速预估样品的效价值^[15],从而实现在远低于效价值处增加滴定液加入体积,在接近效价值处控制($\Delta V \times C_T$)/($V_S \times C_S$)浮动不大于10 U,提高实验效率和准确度。硫酸鱼精蛋白供试品溶液配制后应尽快进行滴定测定,建议在4 h 内完成滴定测定。

为了进一步验证方法耐用性,本方法将在不同的试验室进行方法学验证,为方法的推广奠定基础。

参考文献

- [1] ASHLEY C, MICHAEL T, DAVID A, *et al.* Modern analytics for naturally derived complex drug substances: NMR and MS tests for protamine sulfate from chum salmon[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2015, 407(29): 749
- [2] JAKUES L. Protamine—antagonist to heparin[J]. *Can Med Assoc J*, 1973, 108(10): 1291
- [3] 傅红霞,杜荣茂,应铁进,等. 鱼精蛋白的研究现状及其发展前景[J]. *食品科技*, 2003, 10(4): 25
- FU HX, DU RM, YING TJ, *et al.* The present condition and prospect of protamine[J]. *J Agric Univ*, 2003, 10(4): 25
- [4] 谢安,魏蔚. 鱼精蛋白的应用现状及存在的问题[J]. *中国胸心血管外科临床杂志*, 2016, 23(1): 78
- XIE A, WEI W. Application status and existing problems of protamine[J]. *Chin J Clin Thorac Cardiovasc Surg*, 2016, 23(1): 78
- [5] POON MC, HURST RC, RIVES MS. Platelet factor four and protamine sulfate neutralization of heparin fractionated according to anionic charge density[J]. *Thromb Haemost*, 1982, 47(2): 162
- [6] USP38-NF 33[S]. 2015: 5069
- [7] EP8.0[S]. 2014: 3125
- [8] JP16[S]. 2011: 1316
- [9] 中国药典 2015 年版. 四部[S]. 2015: 1213
- ChP2015.Vol IV[S]. 2015: 1213
- [10] JAKUES L. Protamine—antagonist to heparin[J]. *Can Med Assoc J*, 1973, 108(10): 1291
- [11] CHEN C, WANG C, HUANG C. The value of D-dimer in the detection of early deep-vein thrombosis after total knee arthroplasty in Asian patients: a cohort study[J]. *Thromb J*, 2008, 6(1): 5
- [12] BP 2014[S]. 2014: 586
- [13] SNYCERSKI A, DUDKIEWICZ-WILCZYNSKA J, TAUTT J. Determination of protamine sulphate in drug formulations using high performance liquid chromatography[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 1998, 18(4-5): 907
- [14] TAYLORFB J, TOHCH, HOOTS WK, *et al.* Towards definition, clinical and laboratory criteria, and a scoring system for disseminated intravascular coagulation[J]. *Thromb Haemost*, 2001, 86(5): 1327
- [15] LED M. Current understanding of disseminated intravascular coagulation[J]. *Br J Haematol*, 2004, 124(5): 567

(本文于2016年8月31日收到)