

人凝血酶国家标准增订概况^{*}蒋玉辉¹, 梁蔚阳¹, 黄瑶¹, 赵沁², 曹琰³

(1. 广东省药品检验所, 国家药品监督管理局血液制品质量控制重点实验室, 广州 510663;

2. 上海市食品药品检验研究院, 上海 201203; 3. 国家药典委员会生物制品处, 北京 100061)

摘要 **目的:** 正确理解和使用 2020 年版《中国药典》新增各论品种“人凝血酶”, 为本品种的国家标准的顺利实施提供应用指南。**方法:** 从新增背景、国内外标准比较、关键质量属性制定过程几方面对人凝血酶各论增订情况进行简述。**结论:** 将人凝血酶企业注册标准上升为国家药典标准, 有利于血液制品的科学监管。

关键词: 人凝血酶; 2020 年版《中国药典》; 国家标准; 药典各论; 质量控制; 血液制品

中图分类号: R 921. 2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-3656(2023)02-0000-00

doi: 10.19778/j. chp. 2023. 02. 00?

Overview of updates and amendments of the national standard for human thrombin^{*}JIANG Yuhui¹, LIANG Weiyang¹, HUANG Yao¹, ZHAO Qin², CAO Yan³

(1. Guangdong Institute for Drug Control, NMPA Key Laboratory of Blood Products Quality Control, Guangzhou 510663, China; 2. Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203, China;

3. Biological Products Division, Chinese Pharmacopoeia Committee, Beijing 100061, China)

Abstract **Objective:** To Correctly understand and use the new variety “human thrombin” in the Chinese Pharmacopoeia 2020, and provide application guidelines for the smooth implementation of national standards for this variety. **Methods:** The revision of the monothery of human thrombin was summarized from the new background, the comparison of domestic and foreign standards and the formulation process of key quality attributes. **Conclusion:** Raising the registration standard of human thrombin enterprises to the national pharmacopoeia standard is conducive to the scientific supervision of blood products.

Key words: human thrombin; Chinese Pharmacopoeia 2020; national standard; pharmacopoeia of individual; quality control; blood products

人凝血酶属于血液制品,是由健康人血浆,先制备出凝血酶原复合物后,经钙离子活化、离子交换法纯化,并经病毒去除和灭活处理、冻干制成。本品主要成分为人凝血酶,含适量稳定剂,不含防腐剂和抗

生素。辅助用于外科止血。《中华人民共和国药典》(简称《中国药典》)2015 年版并未收载该品种。为加强对其安全性和有效性的控制,该品种纳入了《中国药典》2020 年版三部收载。该品种各论为

^{*} 基金项目:国家药典委员会药品标准制修订研究课题(354#);广东省药品监督管理局科技创新项目(2021ZDZ02);广东省医学科学技术研究基金项目(222285)

第一作者简介:蒋玉辉,副主任药师;研究方向:药品质量控制。Tel:020-32447931;E-mail:jiangyuhui@gdide. org. cn

2018 年国家药品标准提高课题,由广东省药品检验所承担相关研究和起草工作,上海市食品药品检验研究院复核。本文介绍了人凝血酶各论标准研究及增订情况,旨在为业界相关人员正确理解和实施新版药典提供参考。

目前我国有人凝血酶生产企业 2 家,批准文号 2 个,企业注册标准 2 个^[1,2],《中国药典》2015 年版二部收载有“凝血酶冻干粉”(来源于牛或猪)^[3],三部收载的“人纤维蛋白黏合剂”中有“外用人凝血酶”^[4],日本药局方第 18 版中收载有“凝血酶”(来源于人或牛)^[5],USP-NF Online 以试剂形式收录了人凝血酶(Ⅱa 因子)^[6],BP2022、EP10.0 等均未收载。笔者通过对各国药典和企业注册标准逐项比较,在企业标准基础上修订了《中国药典》2020 年版三部的新增各论“人凝血酶”中凝血酶效价和蛋白质含量检测方法,同时将各论“人纤维蛋白黏合剂”中的“外用人凝血酶”^[7]标准进行了统一。

“人凝血酶”的各论内容包括:基本要求、制造、检定、保存运输及有效期、使用说明 5 个部分。现将其中关键质量参数的制定情况进行报告。

1 仪器与试药

1.1 仪器

上海欣益仪表有限公司 FP6410 型火焰光度计、Thermo MK II M6 原子吸收分光光度计、Waters 2690/410 高效液相色谱仪、WATERS e2695/2998 高效液相色谱仪、SHIMADZU UV-2550 紫外-可见分光光度计、StagoCompactMax 自动血凝仪、MERLIN medical MC4 plus 自动血凝仪、Sartorius CP224S 万分之一天平、Sartorius CAP225D 十万分之一天平。

1.2 试药

人凝血酶国家标准品(批号:20131217)、血清白蛋白(牛)对照品(批号:140619-201723)、纤维蛋白原(批号:140626-202012)、抗血浆鉴别试剂盒(批号:20150101)、蔗糖对照品(批号:11507-201303)、甘氨酸对照品(批号:140689-201103)均来自中国食品药品检定研究院;葡萄糖酸钠对照品(Sigma,批号:047k0114);钙离子国家标准溶液 GSB G 62012-90(2001)(国家钢铁材料测试中心,1 000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,批号:18011113);钙测定试剂盒(偶氮肿Ⅲ法)[德赛诊断系统(上海)有限公司,批号:00004317]; γ -氨基丁酸(Paladdin,批号:E1427036);福林酚(Sigma,批号:BCBV9444);磺基水杨酸、醋酸钠、氯化钠均为分析纯;乙腈为色谱纯。

人凝血酶 4 批,由不同企业提供,见表 1。

表 1 实验采用的样品信息

Tab. 1 Sample information used in the experiment

生产企业(manufacturer)	A		B	
编号(code)	1#	2#	3#	4#

2 方法与结果

2.1 品名

企业标准中品名有外用冻干人凝血酶、冻干人凝血酶 2 种,根据《中国药典》“生物制品通用名称命名原则”,本品仅有一种剂型和给药途径,因此将本品名称统一修订为“人凝血酶”。

2.2 鉴别试验

按《中国药典》通则 3403“免疫双扩散”法操作,将 1#、2#、3#样品用 2 mL 注射用水复溶后,与抗血浆鉴别试剂盒中 2 倍工作浓度的兔抗人血浆有沉淀线(图 1A);将 4#样品按标示量用水复溶后,再用生理氯化钠溶液稀释 2、4、8、16 倍,各稀释度下均和兔抗人血浆有沉淀线(图 1B);4 批样品和抗马、牛、羊、猪血浆均无沉淀线。

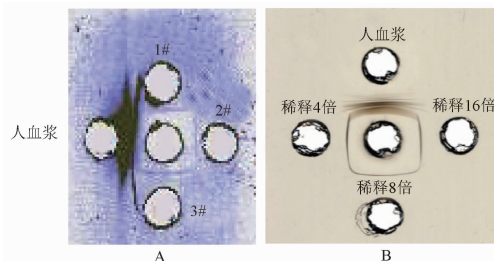


图 1 样品均与兔抗人血浆产生沉淀线

Fig. 1 The sample and rabbit anti human plasma produce precipitation lines

2.3 钠离子含量

人凝血酶生产工艺中使用了较多钠盐,按照《中国药典》通则 3110“钠离子测定法”进行检验,分别使用火焰光度计和原子吸收分光光度计火焰系统测定钠离子,4 批样品结果见表 2,2 种仪器测定结果相近。

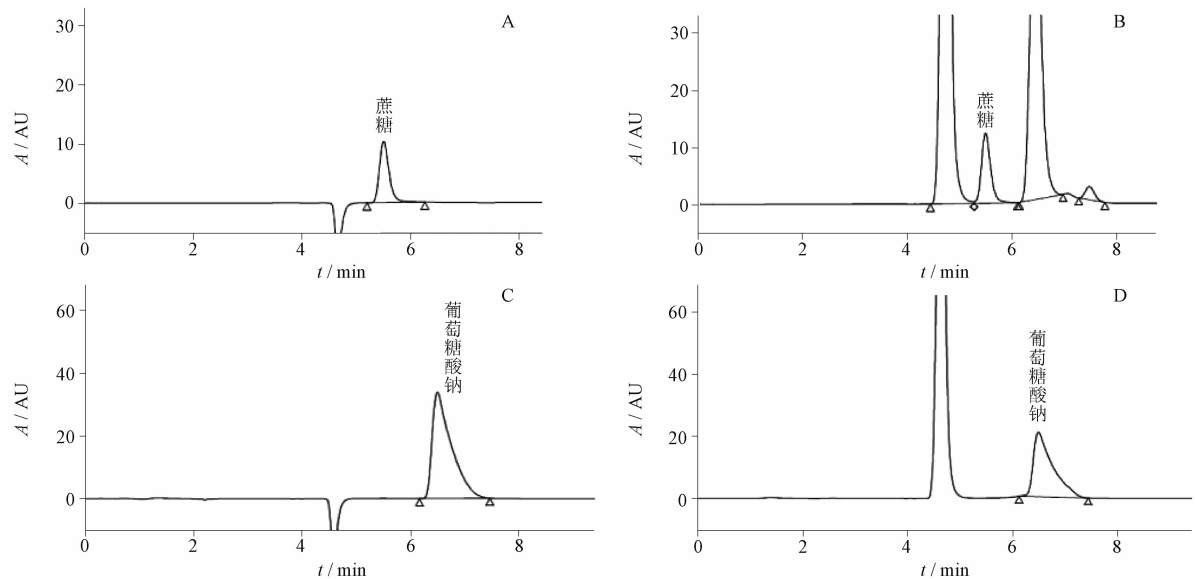
2.4 糖含量

B 企业制品处方中添加了蔗糖、葡萄糖酸钠,参照《中国药典》通则 3120“人血液制品中糖及糖醇测定法”,使用 Waters 2690/410 高效液相色谱仪, Aminex HPX-87H 300 mm $\times$ 7.8 mm 色谱柱,流动相为 0.004 mol $\cdot$ L⁻¹ 硫酸溶液进行检测。色谱图见图 2。

表2 钠离子含量检查结果

Tab.2 Sodium ion content inspection results

生产企业 (manufacturer)	编号 (code)	火焰光度计 (flame photometer)/(mmol · L ⁻¹)	原子吸收分光光度计 (atomic absorption spectrometry)/(mmol · L ⁻¹)
A	1#	385.6	388.0
	2#	385.6	373.0
	3#	388.4	385.7
B	4#	233.5	288.9



A,C. 蔗糖、葡萄糖酸钠对照品 (reference standards) B、D. 4#样品 (sample 4#)

图2 糖含量色谱图

Fig.2 Chromatogram of sugar content

测得蔗糖标准曲线方程为： $y = 1\,371\,609.82x + 258.25$, $R = 1$ 。葡萄糖标准曲线方程为 $y = 8\,233\,484.25x - 5\,793.00$, $R = 1$ 。4#样品中蔗糖 $5\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 葡萄糖酸钠 $148\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.5 甘氨酸含量

2家企业制品中均添加了甘氨酸作为稳定剂。采用 AccQTag 方法柱前衍生,液相色谱仪为 Waters e2695/2998,色谱柱为 Kromasil 100-5 C₁₈(4.6 mm × 250 mm),内标溶液为 $2\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ γ-氨基丁酸溶液,以 $0.14\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酸钠(pH 5.0)为流动相 A、60% 乙腈为流动相 B,梯度洗脱,检测波长 248 nm。色谱图见图 3。经验证,当进样量为 0.018 795 ~ 0.375 92 μg 时,甘氨酸进样量与峰面积成正比,线性方程为 $y = 57.666\,4x + 0.017\,3$ $R = 0.999\,8$

重复性试验 RSD0.6% ($n = 6$),精密度试验 RSD 为 1.0% ($n = 6$)。本方法甘氨酸的定量限为 2 ng,检测限为 0.9 ng。样品加标平均回收率为 100.4%,RSD1.6% ($n = 9$)。1#、2#、3#样品中甘氨酸

均为 $10\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,4#样品中甘氨酸为 $3\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.6 钙离子含量

B企业成品中添加了氯化钙,因为钙离子会促进凝血酶和纤维蛋白原的凝结反应,影响凝血酶的效价测定,故需要对其进行检查。将钙离子国家标准溶液用 0.9% 氯化钠溶液稀释为 1、2.5、3.5、5、6.25 mmol · L⁻¹,作为标准曲线溶液,将样品用水复溶后,作为供试品溶液,采用钙测定试剂盒(偶氮肿Ⅲ法),按试剂盒说明书进行检测。标准曲线方程为: $y = 0.174x + 0.440$, $R = 0.998$ 。测得 4#样品钙离子含量为 $60\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,1#、2#、3#样品均未检出钙离子。

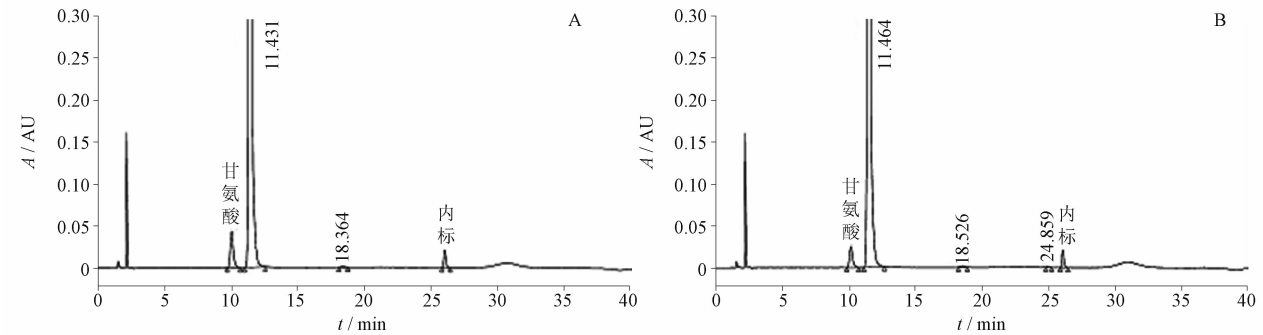
2.7 人凝血酶效价测定

人凝血酶国家标准品用含 1% 人血白蛋白的 0.9% 氯化钠溶液依次稀释至 19.4、9.7、4.85、2.425 IU · mL⁻¹。样品用注射用水复溶后,按标示量用含 1% 人血白蛋白的 0.9% 氯化钠溶液稀释至约 $10\text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。在 Stago 全自动血凝仪上设置程

序:取标准品溶液、样品溶液各 50 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 保温 2 min, 加入 2 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 纤维蛋白原溶液 150 μL , 平行检测二管, 记录凝固时间。以标准品溶液效价 ($\text{IU} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的对数对应相应凝固时间 (秒) 的对数作直线回归, 根据直线回归方程计算样品中人凝血酶的效价。直线回归方程为 $y = -0.567x + 1.346$, $R = 0.999$, 1 # 样品重复性试验 RSD 为 4.3%

($n = 6$), 4# 样品重复性试验 RSD 为 4.5% ($n = 6$)。精密度试验 RSD 为 3.7% ($n = 6$)。样品加标平均回收率: 3# 样品 112.7%, RSD 4.5% ($n = 9$); 4# 样品 108.6%, RSD 4.2% ($n = 9$)。样品检测结果见表 3。

使用 MERLIN medical MC4 plus 自动凝血仪同法测定, 4 批样品检测结果相对偏差均小于 5% (表 3)。



A. 甘氨酸对照品 (reference standards) B. 1#样品 (sample 1#)

图 3 甘氨酸含量色谱图

Fig. 3 Chromatograms of glycine content

表 3 人凝血酶效价测定结果

Tab. 3 Results of human thrombin titer determination

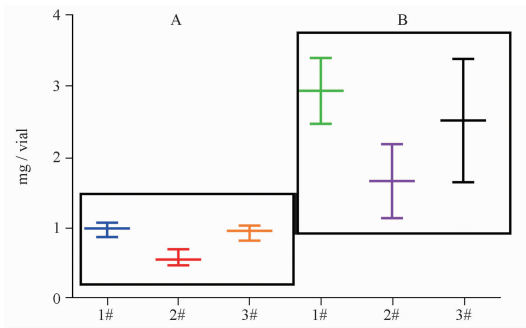
生产企业 (manufacturer)	编号 (code)	Stago 全自动凝血仪 (Stago CompactMax)/(IU $\cdot$ vial $^{-1}$)	MERLIN 自动凝血仪 (MERLIN medical MC4 plus)/(IU $\cdot$ vial $^{-1}$)	SD/%
A	1#	1 159	1 068	4.1
	2#	975	897	4.2
	3#	1 058	996	3.0
B	4#	1 230	1 117	4.8

2.8 蛋白质含量

因 B 企业半成品配制时加有 5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 人血白蛋白, 故其只检查原液的蛋白质含量, 成品中不检查该项。不同实验室分别根据《中国药典》2020 年版通则 0731“蛋白质含量测定法”第一法凯氏定氮法和第二法福林酚法 (Lowry 法) 方法 2 对 A 企业样品进行检测, 结果趋势基本一致。由图 4 可见, 对于同一个样品, 不同实验室凯氏定氮法的检测结果偏差较大, 而 Lowry 法尽管测得蛋白含量较低, 但实验室之间偏差仍远小于凯氏定氮法。对 Lowry 法进行了方法确认, 血清白蛋白 (牛) 对照品标准曲线为 $y = 3.07149x - 0.00042$, $R = 0.995$ 。重复性试验 RSD 0.8% ($n = 6$), 精密度试验 RSD 为 2.5% ($n = 6$), 样品加标平均回收率为 102.4%, RSD 2.2% ($n = 9$)。

2.9 比活性

根据人凝血酶效价和蛋白质含量, 计算得样品的比活性见表 4。



A. Lowry 法 (Lowry method) ($n = 3$) B. 凯氏定氮法 (Kjeldahl method) ($n = 2$)

图 4 蛋白质含量测定结果

Fig. 4 Protein content determination results

3 讨论

3.1 鉴别试验

采用免疫双扩散法对样品进行鉴别时, A 企业样品因蛋白含量较低, 不能按标示量将样品复溶, 样

品和抗血浆的浓度均要增加方能显示出沉淀线。B 企业样品因含有 $5\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 人血白蛋白,即使按标示量复溶后再稀释 16 倍,依然能与抗人血浆产生沉淀线。本品属于人血液制品,为保证产品安全性,应进行种属来源的鉴别检查,以防止其他种属血浆来源产品的混淆。

表 4 比活性检测结果

Tab. 4 Specific activity test results

编号 (code)	Lowry 法比活性 (specific activity of Lowry method)/(IU · mg ⁻¹)	凯氏定氮法比活性 (specific activity of Kjeldahl method)/(IU · mg ⁻¹)
1#	1 180	345
2#	1 782	452
3#	1 115	317

3.2 人凝血酶效价测定

2 个企业标准中凝血酶效价均采用目视法观察凝血酶和纤维蛋白原的凝固情况判断凝固终点,检测结果容易受到操作人员的经验和熟练程度影响。本研究采用自动血凝仪,尤其是全自动血凝仪,由于加样、孵育、计时均可程序化设置,保证了每次操作的一致性,可使结果重复性更好、更加客观,符合《药品生产质量管理规范》(2010 年修订)数据可靠性要求^[8]。

3.3 蛋白质含量

A 企业标准中采用钨酸沉淀法检测本品蛋白质含量,该方法是通过测定样品总氮含量及经钨酸沉淀去除蛋白的样品滤液中非蛋白氮含量,计算蛋白质含量。研究表明,采用该方法检测时,不同实验室之间结果偏差可高达 35%。已有文献报道,当血液制品中甘氨酸含量较高时,钨酸沉淀法测得的蛋白质含量偏高^[9]。人凝血酶成品中目标蛋白含量较低,但含有 $10\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的甘氨酸辅料,其含量远大于蛋白质含量,影响了蛋白质检测,因此本品更适于通过去除甘氨酸干扰后、采用适用于微量蛋白检测的 Lowry 法进行蛋白质含量检测。本研究采用脱氧胆酸盐-三氯醋酸沉淀样品中的蛋白质,取蛋白沉淀后按 Lowry 法检测其蛋白质含量。凯氏定氮法测定蛋白质含量范围为 $1.25 \sim 12.5\text{ mg}$ 蛋白质,是 Lowry 法测定蛋白质范围 ($20 \sim 250\text{ }\mu\text{g}$) 的数百倍以上,不适合用于检测本品中较低的蛋白质含量。经方法学验证,Lowry 法的测定结果准确、重复性好,

实验室之间偏差更小。基于以上研究结果,2020 年版《中国药典》三部本品各论未采用传统的钨酸沉淀法,而是采用药典通则“蛋白质含量测定法”中的福林酚法(Lowry 法)的方法 2^[10]对本品的蛋白质含量进行检测。由于 Lowry 法测得的蛋白质含量结果较低,相应的其比活性结果远大于凯氏定氮法。

4 结论

人凝血酶属于国家批签发管理的生物制品,在企业注册标准基础上建立国家药品标准,有利于控制产品的安全、有效性和上市后科学监管。此外,由于大部分血液制品品种已上市多年,随着检验检测技术发展,建议对现有国家标准进一步升级和更新,可考虑引入一些新的技术方法,如采用仪器检测法代替肉眼观察、定量方法代替半定量方法等,以期更加准确、有效的控制血液制品的质量。

参考文献

[1] 国家食品药品监督管理局药品注册标准 YBS00152003[S]. 2003
SFDA drug registration standards;YBS00152003[S]. 2003
[2] 国家食品药品监督管理局总局标准 WS4-(S-002)-2014Z[S]. 2014
CFDA Standards;WS4-(S-002)-2014Z[S]. 2014
[3] 中华人民共和国药典 2015 年版. 二部[S]. 2015;1561
ChP 2015. Vol II [S]. 2015;1561
[4] 中华人民共和国药典 2015 年版. 三部[S]. 2015;276
ChP 2015. Vol III [S]. 2015;276
[5] JP 18[S]. 2021;1257
[6] https://online.uspnf.com/uspnf/document/1_GUID-FB6B1A1C-8A73-401D-8E0F-1D9BC2ED3E4A_1_en-US?source=Search%20Results&highlight=thrombin
[7] 中华人民共和国药典 2015 年版. 三部[S]. 2015;277
ChP 2015. Vol III [S]. 2015;277
[8] 中国人民共和国卫生部. 药品生产质量管理规范(2010 年修订)[S]. 2011
Ministry of health of the people's Republic of China. Good Manufacturing Practice for Pharmaceutical Products (Amended in 2010) [S]. 2011
[9] 周志军,李策生,李陶敬,等. 检测人凝血因子Ⅷ蛋白质含量的 BCA 法的优化及验证[J]. 中国生物制品学杂志,2013,26(10):1488
ZHOU ZJ, LI CS, LI TJ, et al. Optimization and verification of BCA method for determination of protein content in human coagulation factor Ⅷ[J]. Chin J Biol,2013,26(10):1488
[10] 中华人民共和国药典 2020 年版. 三部[S]. 2020;490
ChP 2020. Vol III [S]. 2020;490

(收稿日期:2022-07-17)