

肝素钠的兔血浆与羊血浆效价测定平行性考察

莫宗琪¹, 刘延凤¹, 吴金虎¹, 孔凡贞¹, 董雪娣²(1. 济南军区药剂研究中心, 青岛 266071; 2. 青岛海洋药物所, 青岛 266071)

摘要: 目的: 采用兔血浆法和羊血浆法测定肝素钠的效价, 比较两种方法在临床操作过程中的可行性并考察两种方法测定结果的平行性。方法: 采用兔血浆和羊血浆法。结果: 羊血浆法比兔血浆法易于掌握, 误差较小。结论: 采用羊血浆法优于兔血浆法。

关键词: 肝素钠; 兔血浆法; 羊血浆法

中图分类号: TQ460.7⁺2 文献标识码: B 文章编号: 1006-0111(2000)03-0159-03

To study the potency of heparin sodium in rabbit plasma and sheep plasma

MO Zong-qi, LIU Yan-feng, WU Jin-hu, KONG Fan-zhen, DONG Xue-di (The Pharmaceutical Research Center of Jinan Military Area, Qingdao 266071)

ABSTRACT: OBJECTIVE: To compare the feasibility of two methods in clinic. **METHODS:** Rabbit plasma and sheep plasma were adopted to determine the potency of heparin sodium. **RESULTS:** Sheep plasma method was easier than rabbit plasma. **CONCLUSION:** We should adopt sheep plasma method to determine heparin sodium.

KEY WORDS: heparin sodium; rabbit plasma; sheep plasma

肝素钠系自猪或牛的肠粘膜中提取的硫酸氨基葡萄糖的钠盐, 具有延长血凝时间的作用, 其效价测定方法《中国药典》为兔血浆法, 《美国药典》为羊血浆法, 本文运用两种方法对肝素钠进行了效价测定, 现报道如下。

1 仪器与试剂

电热恒温水箱(上海电工医疗器械厂), 肝素钠标准品(中国药品生物制品检定所), 肝素钠注射液(100u/ml, 自制), 氯化钠, 枸橼酸钠, 氯化钙(分析纯), 兔血浆(自制), 羊血浆(自制)。

2 试验方法

2.1 标准品的配制

精密称取肝素钠标准品适量, 置 50ml 干燥容量瓶中, 用适量煮沸放冷的水溶解, 定容, 配成为 100u/ml 的溶液, 置 4~8℃ 保存备用。取前溶液用生理盐水分别配成 0.969、1.14、

1.34u/ml 的溶液, 待用。

2.2 供试品的稀释

精密量取肝素钠注射液适量, 用生理盐水分别配成 0.969、1.14、1.34u/ml 的溶液, 待用。

2.3 兔血浆法^[1]

迅速收集兔血置预先放有 8% 枸橼酸钠溶液的试管中, 枸橼酸钠溶液与血液容积之比为 1:19, 边收集边轻轻振摇, 混匀, 迅速离心(2000r/min) 约 20min, 立即分出血浆, 取 0.8ml 血浆于洁净试管中, 加 1% 氯化钙溶液 0.2ml, 立即混匀, 置 37℃ 恒温水浴中, 若 3~5min 内凝固则血浆可用。取管径均匀、清洁干燥的小试管若干支, 分别加入血浆 0.8ml, 置(37±5)℃ 恒温水浴中预热 5~10min 后, 依次每管加入一种浓度的标准品或供试品稀释液及氯化钙溶液(每种浓度不得少于 3 管, 各浓度的试管支数相等), 加入氯化钙溶液后, 立即混匀, 避免产生气

泡,并开始计算时间,注意观察并记录各管凝结时间。将各管凝结时间换算成对数,照生物检定统计法(中国药典附录 XIV)中的量反应平行线测定法计算效价及实验误差。

2.4 羊血浆法^[2]

2.4.1 羊血浆 迅速收集羊血置预先放有 8% 枸橼酸钠溶液的试管中,枸橼酸钠溶液与血液容积之比为 1:19,边收集边轻轻振摇,混匀,迅

速离心(2000r/min)约 20min,立即分出血浆,取 1ml 血浆于洁净试管中,加 1% 氯化钙溶液 0.2ml,立即混匀,置 37℃ 恒温水浴中,若 5min 内有凝块形成则血浆可用,低温冷冻贮存备用。

2.4.2 测定标准液 1/2 凝固度所需大致的体积数 用生理盐水分别将标准品溶液精密配成 8u/ml 的浓度;取 18 支具塞试管,按下面顺序操作(见表 1):

表 1 测定标准液 1/2 凝固度

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
肝素钠(μl)	80	90	100	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250
血浆(ml)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
0.25% CaCl ₂ (ml)	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8

盖好管塞后,每管依同样的方式倒转 3 次,混匀内容物,并使整个内壁润湿,垂直装管子于 (37±0.5)℃ 恒温水浴试管架中,并开始计时,

60min 后一次取出所有管子,按表 2 的标准记录凝固程度。

表 2 判定标准液 1/2 凝固大致体积

凝固程度	判断标准
完全凝固	溶液完全凝固,倒转管子并猛敲一下,凝块不从管壁脱落
3/4 凝固	溶液完全凝固,但倒转管子并猛敲一下时,凝块能从管壁脱落
2/4 凝固	大约一半体积的溶液凝固
1/4 凝固	很少溶液体积是凝固的
0 凝固	溶液完全流动

确定标准液 1/2 凝固大致体积,如果 80~250μl 的所有管子出现全凝或全不凝,则该血浆不可用,应稀释血浆或调整肝素钠浓度。如果这系列中有全凝的、不凝的并带有较少流动的,则血浆可用。在这系列中有出现的部分凝固(1/4、2/4、3/4),可记录溶液出现 1/2 凝固度的体积为 $V_{1/2}$ 。如果相邻两管是全凝和完全不凝,可计算平均体积 $V_{1/2}$ 。

2.4.3 供试品的测定 用生理盐水分别将供试品溶液精密配成 8u/ml 的浓度;取具塞试管,标准液 2 组,样品测定液 2 组,以标准液 $V_{1/2}$ 作中间数,上下每隔 5μl,各做 3 管,即 $V_{1/2}-15μl$ 、 $V_{1/2}-10μl$ 、 $V_{1/2}-5μl$ 、 $V_{1/2}$ 、 $V_{1/2}+5μl$ 、 $V_{1/2}+10μl$ 、 $V_{1/2}+15μl$ 。按 2.4.2 项中操作,如测定系列中出现 1/2 凝固度,则相应肝素加入量即为 $V_{1/2}$ 体积。如果测定系统中跳过 1/2 凝固度,如第一管全凝,第二管是 1/4 凝固,则应计算其

$V_{1/2}$ 体积,计算公式如下:

$$V_{1/2} \text{ 体积} = \frac{\text{相邻两管中的大体积微升数} - \text{相邻两管微升之差} \times \frac{1/2 - \text{小凝固度}}{\text{大凝固度} - \text{小凝固度}}}{}$$

2.4.4 供试品的效价计算

$$\text{计算样品的效价单位} = \frac{V_{std} \times C_{std} \times V}{V_{sam} \times W_{sam}}$$

V_{std} 标准品 1/2 凝固度的肝素加入体积(μl)

C_{std} 标准品肝素溶液的浓度(u/ml)

V_{sam} 测定样品的 1/2 凝固度的肝素加入体积(μl)

W_{sam} 测定样品称取的重量(mg)

V 测定样品的总体积(ml)

两次测定误差不得超过 ±5u/mg, 否则要重复测定。

3 实验结果

3.1 兔血浆法

表 3 兔血浆法肝素钠效价测定结果

	标准品凝血时间对数值			供试品凝血时间对数值		
	0.096	1.140	1.340	0.096	1.140	1.340
1	1.021	1.182	1.352	1.013	1.179	1.342
2	1.107	1.176	1.362	1.025	1.176	1.362
3	1.041	1.161	1.354	1.017	1.155	1.338

根据《中国药典》生物检定统计法(附录 XIV)中的量反应平行线测定法计算得样品效价为 134.5u/ml,可信限为 0.96%,回归项 $P < 0.01$,非常显著,偏离平行、二次曲线、反向二次曲线回归,均不显著。

3.2 羊血浆法

表 4 羊血浆法肝素钠效价测定结果

	加入肝素体积(μ l)					
	105	110	115	120	125	130
标准品	半凝					
样品	全凝 不凝					

样品效价 = $143.01 \pm 1.6u/mg (n=2)$

4 讨论

4.1 本文按照中国药典的肝素生物检测法(兔血浆法)和美国药典的肝素生物检测法(羊血浆法)分别对自制肝素注射液进行了效价测定,兔血浆法测得的结果为 134.5u/mg,羊血浆法测得的结果为 143.0u/mg,羊血浆法高于兔血浆法约 8%。

4.2 兔血浆法血浆的性质对本实验的操作影响较大,每一批血浆需进行预试,先摸出一个高或低剂量,有时随着血浆的放置、凝血时间等变化而发生变化,则需重新摸索;对于凝固终点的判定不易识别,有的是表面已凝而内部并未全

凝,倒立时也不掉出,出现假全凝现象;一个剂量三管中常有一管的凝固时间与其它两管差异较大,需重复测定,以上致使本法的操作比较繁琐,误差较大,不易掌握。

4.3 羊血浆法的操作比较简便,凝固终点的判定比较容易识别,相邻两管的凝固现象差别比较明显,两次的测定误差较小。比较而言,本文认为采用羊血浆法优于兔血浆法。

4.4 关于两种方法测定的结果,哪一种更接近于真实值,本实验无法进一步确定。据报道^[3],当标准品和样品均为肠肝素时,羊血浆测得的效价与兔血浆的结果没有显著差别,当标准品为肠肝素,样品为肺肝素时,羊血浆测得的结果约偏高 15%,以后的肝素效价测定中国药典是否效法美国药典(XXII 版)采用羊血浆法,本文仅能提供参考,更多的工作还有待于进一步的深入和多方面的考查。

参考文献:

- [1] 中国药典[M]. 1995. 附录 97.
- [2] 《USP》(XXII). 1995. 736-738.
- [3] 王鑫鼎. 肝素对羊、兔血浆体外抗凝作用剂量反应关系的比较[J]. 药物分析杂志, 1985, 5(1): 35.

收稿日期: 1999-10-18

《药物经济学》新书征订

由世界卫生组织执行主任、著名医院管理专家、上海医科大学陈洁教授主编的《药物经济学》一书已于 2000 年 4 月底正式出版。该书由上海医科大学、第二军医大学部分从事药物经济学研究的教师和三位美籍华裔学者共同编写完成,是国内第一本系统讲述药物经济学基本原理、研究方法及其应用的专著。全书既有药物经济学理论的系统介绍,又有对药物经济学研究设计和分析的详细描述,同时附有研究实例,是一本通俗易懂、操作性强的参考书籍。本书既可作为卫生决策部门、药品生产、经营企业、临床医师和药师开展药物经济学研究的一本参考书,又可作为医药院校开设药物经济学课程的培训教材。

全书约 35 万字。定价 20.00 元,如需邮寄另加邮资 3.00 元。需订购者请直接与上海市国和路 101 号《药理学实践杂志》编辑部联系,邮编: 200433 联系人: 何志高 电话: 021-25070346