·实验研究·

肝素抗 Xa 因子和抗 Ⅱa 因子效价测定用标准试剂的研制

王　悦,李　京,王鑫钰,刘莉莎,范慧红
(中国食品药品检定研究院,北京 102629)

[摘要]　**目的**:研制我国首批肝素、低分子肝素抗 Xa 因子和抗Ⅱa 因子效价测定用标准化试剂。**方法**:Ⅱa 因子试剂使用纤维蛋白原凝固法对效价进行赋值,效价溯源至凝血酶国家标准品;抗凝血酶Ⅲ采用生色底物法对效价进行赋值,效价溯源至 WHO 国际对照品;Xa 因子效价采用全自动血凝仪进行测定,溯源至国家人凝血因子国家标准品;S-2765,S-2238 生色底物和游离 pNA 含量采用反相色谱进行分离,色谱柱为 Agela Technologies Venusil XBP RP C_{18}(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相 A 为 20% 乙腈与 0.1% 三氟醋酸溶液,流动相 B 为 60% 乙腈与 0.1% 三氟醋酸溶液;检测波长:313 nm;梯度洗脱;酶和底物亲和力通过米氏常数进行评价。**结果**:Ⅱa 因子、Xa 因子、抗凝血酶每支效价结果分别为 40 IU、76.3 nKat 和 10 IU;pNA 的定量限与检出限分别为 7.6 和 2.3 ng·mL^{-1};线性范围为 0.005 ~ 100 μg·mL^{-1},r = 1.0;加样回收率在 98.5% ~ 102.3% 范围内;S-2765,S-2238 发色底物含量分别为 96.2% 和 97.3%;进口试剂与标准试剂米氏常数无统计学差异。**结论**:通过本研究对标准试剂较为全面的质量考察结果来看,标准试剂可完全替代进口试剂,且标准试剂效价赋值更为准确。

[关键词]　肝素;低分子肝素;Xa 因子;Ⅱa 因子;抗凝血酶;发色底物
[中图分类号] R917　　[文献标志码] A　　[文章编号] 1003 - 3734(2021)01 - 0073 - 07

Development of standard reagents for heparin anti-FXa and anti-FⅡa assay

WANG Yue, LI Jing, WANG Xin-yu, LIU Li-sha, FAN Hui-hong
(*National Institute for Food & Drug Control*, *Beijing* 102629, *China*)

[**Abstract**]　**Objective**: To develop the first batch of standardized reagents for the potency assay of heparin, low-molecular-weight heparin (LMWH) anti-factor Xa and anti-factor Ⅱa. **Methods**: Fibrinogen coagulation method was used for factor Ⅱa reagent to assign the potency, which was calculated with the national standard of thrombin. Chromogenic substrate method was used for antithrombin Ⅲ to assign the potency, which was calculated with the WHO international standard. The potency of facor Xa was measured using a fully automatic hemagglutination instrument, calculated with the national standard of human coagulation factor. The purity and free pNA content of chromogenic substrates S-2765 and S-2238 were analyzed by reversed-phase chromatography. The separation was obtained by the column Agela Technologies Venusil XBP RP C_{18}(250 mm×4.6 mm,5 μm) using mobile phase A of 20% acetonitrile solution which contained 0.1% trifluoroacetic acid and phase B of 60% acetonitrile solution which contained 0.1% trifluoroacetic acid in a gradient elution. The wavelength was set at 313 nm. The constant Km was calculated to evaluate the enzyme and substrate affinities. **Results**: The standard reagent potency of factors Ⅱa, Factor Xa, and Antithrombin III were 40 IU, 76.3 nKat, and 10 IU per vial, respectively. The limit of quantification (LOQ) and detection limit of detection (LOD) of pNA were 7.6 ng·mL^{-1} and 2.3 ng·mL^{-1}; the linear range is 0.005 ~ 100 μg·mL^{-1}(r = 1.0); the sample recovery rate is in the range of 98.5% ~ 102.3%. The contents of chromogenic substrates, S-2765 and S-2238, are 96.2% and 97.3%. There is no statistical difference in Km between imported

[基金项目]　中国食品药品检定研究院中青年发展研究资助项目(2012A5)
[作者简介]　王悦,女,副研究员,研究方向:多糖、酶类等生化药品质量控制。联系电话:(010)53851530,E-mail:wangyue07@nifdc.org.cn。
[通讯作者]　范慧红,女,研究员,研究方向:生化药品质量控制。联系电话:(010)53851585,E-mail:shenghuayaoshi@126.com。

reagents and standard reagents. **Conclusion**: According to the quality test results of standard reagents in this study, it can be seen that standard reagents can completely replace imported reagents, and the value of standard reagents is much accurate compared to imported reagents.

[**Key words**] heparin; low molecular weight heparin; factor Xa; factor Ⅱa; antithrombin; chromogenic substrate

肝素(heparin)和低分子肝素(low molecular weight heparin, LMWH)是目前临床上最为常用的抗凝药物,其抗凝机制在于肝素类药物能与血浆中的抗凝血酶Ⅲ等抗凝蛋白结合,以增强这些抗凝蛋白的生物活性[1-3]。抗凝血酶Ⅲ是血浆中一种丝氨酸蛋白酶抑制物(serine protease inhibitor),其分子上具有精氨酸残基;凝血因子Ⅱa和Xa都属于丝氨酸蛋白酶(serine protease),其活性中心含有丝氨酸残基;抗凝血酶Ⅲ分子上的精氨酸残基可以与这些丝氨酸蛋白酶活性中心的丝氨酸残基结合,"封闭"了这些酶的活性中心而使其失活[4]。

各国药典中LMWH的效价测定方法均是应用这一原理,配制一系列浓度的LMWH样品溶液,依次加入抗凝血酶Ⅲ和凝血因子,未被LMWH和抗凝血酶Ⅲ复合体"封闭"的剩余Ⅱa因子、Xa因子与含有精氨酸或赖氨酸残基的底物如S-2238,S-2765发生反应,底物上带的发色基团游离出来呈黄色,在405 nm波长下测其吸光度值,吸光度值的强弱与LMWH的浓度呈反比,用量反应平行线法可计算出LMWH的量[5-6]。

由于该方法专属性和重现性较好,《中华人民共和国药典》2015年版肝素钠、肝素钙效价测定方法由2010年版收载的血液凝固法测定抗凝效价改为生色底物法测定抗Ⅱa因子效价,世界卫生组织(World Health Organization, WHO)已将抗Ⅱa因子和抗Xa因子活性测定方法作为推荐使用的方法;美国药典(USP)、欧洲药典(EP)等也均对测定方法进行了相应的修改。但是目前该方法测定时所需要的试剂和底物一直以来都依赖进口,价格较高,且出现过市场断供等情况,各试剂公司的产品质量差异也较大。可见,试剂的国产化势在必行,制备和标化出国产试剂可以大幅降低实验成本,还可以进一步保证实验的准确性。

仪器与试药

1 仪器

20-AD高效液相色谱仪(LC-SOLUTION色谱工作站,日本岛津公司);SpectraMax plus 384酶标仪(Molecular Devices公司);全自动血凝仪(STAGO公司);电泳装置(美国Bio-rad公司);Supply-EPS601凝胶成像仪(美国通用电气公司,GE);ABI 4800 Plus基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪(MALDI-TOF美国Waters公司);LAMDA 650紫外可见分光光度计(美国Perkin Elmer公司);KBF 115恒温恒湿箱(德国Binder公司)。

2 试药和试剂

第3次WHO抗凝血酶国际标准品(批号:06/166),2014年建立,包装为2 mL玻璃安瓿,标示效价为4.4 IU·支$^{-1}$;人凝血酶原复合物国家标准品(中国食品药品检定研究院,批号:280017-20130306),Ⅱ因子效价8.64 IU·支$^{-1}$,X因子效价8.77 IU·支$^{-1}$,Ⅶ因子效价2.75 IU·支$^{-1}$;凝血酶原时间(prothrombin time,PT)定标血浆;乏X因子血浆;氯化钙溶液(STAGO公司生产);人凝血酶国家标准品(中国食品药品检定研究院,批号:280013-20131217,97 IU·支$^{-1}$);凝血酶国家标准品(中国食品药品检定研究院,批号:140625200308),牛源,580 IU·支$^{-1}$;纤维蛋白原(中国食品药品检定研究院,批号:140626-201009),牛源,凝固物含量59%;WHO第6次肝素国际标准品(批号:07/328),2009年建立,包装为2 mL玻璃安瓿,标示效价为2 145 IU·支$^{-1}$。

标准抗凝血酶(antithrombin Ⅲ,ATⅢ,人源,10 mL西林瓶包装,10 IU·支$^{-1}$);Xa因子(FXa,牛源,10 mL西林瓶包装,约76.3 nkat·支$^{-1}$);Ⅱa因子(FⅡa,人源,10 mL西林瓶包装,约40 IU·支$^{-1}$);发色底物S-2765(Mw 714.6,10 mL西林瓶包装,21.5 mg·支$^{-1}$)、发色底物S-2238(Mw 625.6,10 mL西林瓶包装,18.8 mg·支$^{-1}$),均购自中国食品药品检定研究院(批号:140825,140826,140827,140834,140835)。短期稳定性样品:于d 0,5分别将上述标准品置于30 ℃、80% RH的恒温恒湿箱中放置,在d 10全部取出,作为短期稳定性10,5 d样品。

ATⅢ(10 IU·支$^{-1}$),FXa(71nKat·支$^{-1}$),S-2765(25 mg·支$^{-1}$),S-2238(25 mg·支$^{-1}$)进口试剂,均购

自 Chromogenix 公司。

三羟甲基氨基甲烷(Tris)、PEG 6000、三氟乙酸均购自 Merck 公司;对硝基苯胺(p-nitroacetanilide,pNA,sigma 公司,纯度:>99.5%);EDTA-2Na、氯化钠、冰醋酸等(国药集团);乙腈(Fluka 公司)。

方　法

1　溶液配制

1.1　Tris 缓冲液(pH 8.4)　取 Tris 6.06 g、氯化钠 10.23 g、乙二胺四醋酸二钠 2.8 g、PEG6000 1 g,加水 800 mL 溶解,用 2 mol·L^{-1}盐酸溶液调节 pH 值至 8.4,加水稀释至 1 000 mL,混匀。

1.2　肝素溶液　取肝素国际对照品 1 支,加 Tris(pH 8.4)缓冲液溶解并稀释制成浓度为 0.1 IU·mL^{-1}的溶液。

1.3　Ⅱa 因子溶液　取Ⅱa 因子 1 支,加 Tris(pH 8.4)缓冲液溶解并稀释制成每 1 mL 约含 5 IU 的溶液。

1.4　抗凝血酶标准品贮备液　取第 3 次 WHO 抗凝血酶国际标准品(批号:06/166)抗凝血酶国际标准品 1 支,加水 1 mL 复溶,将全部内容物转移至 5 mL 量瓶内,用 Tris(pH 8.4)缓冲液彻底洗涤原瓶,并全部转移至量瓶内,加水稀释至刻度,混匀,制成 0.88 IU·mL^{-1}的溶液,分装后于 -20 ℃冻存。

1.5　抗凝血酶效价待标品贮备液　取抗凝血酶标准品 1 支、加 Tris(pH 8.4)缓溶液溶解,整支转出,稀释制成估计效价为 1 IU·mL^{-1}的溶液,混匀,平行配制 5 瓶。

1.6　发色底物 S-2238 溶液　取进口试剂或待标底物 1 支,加水溶解并稀释制成每 3 mmol·L^{-1}的贮备液;使用时用水稀释制成 0.625 mol·L^{-1}的溶液。

1.7　Xa 因子效价测定溶液　分别取人凝血因子标准品、待标品适量,加生理盐水溶解并稀释制成约含待测成分 1.0 IU·mL^{-1}的溶液。

2　抗凝血酶效价标定方法[7]

用 Tris(pH 8.4)缓冲液将抗凝血酶标准品和待标品分别稀释制成浓度范围为 0.01 ~ 0.1 IU·mL^{-1}的系列溶液 S1 ~ S4 和 T1 ~ T4,剂间比为 0.75,分别取 25 μL 加入 96 孔板内,加入等体积肝素溶液后混匀,37 ℃保温 2 min,随后分别加入 50 μL 的Ⅱa 因子溶液和 25 μL 的 S-2238 底物溶液,并分别在37 ℃下反应 2 min。最后加入醋酸溶液终止反应后在 405 nm 波长下读取光吸收值,用 4 × 4 量反应平行线法计算待标品效价。

3　Xa 因子效价标定方法

取人凝血酶原复合物国家标准品(批号:280017-20130306),用生理盐水配成 Xa 因子效价范围在 0.10 ~ 1.00 IU·mL^{-1}之间的系列溶液。取待标品 5 支,分别加生理盐水溶解并配成浓度约 0.5 IU·mL^{-1}的溶液。将上述溶液分别加入乏 X 血浆,放入全自动凝血仪内进行测定。标准品系列溶液以 Log 浓度为横坐标,Log 凝集时间为纵坐标绘制标准曲线,按标准曲线法计算供试品效价。

4　Ⅱa 因子效价标定方法

取人凝血酶国家标准品 (280013-20131217),用生理盐水配成Ⅱa 因子效价范围在 4.5 ~ 10.0 IU·mL^{-1}之间的系列溶液作为标准品系列溶液。取待标品 5 支,分别加生理盐水溶解并配成浓度约 8.0 IU·mL^{-1}的溶液。取 10 mL 试管,分别加入人或牛源纤维蛋白原溶液(分别取人或牛源纤维蛋白原,加水溶解,用 0.05 mol·mL^{-1}磷酸氢二钠溶液或 0.05 mol·mL^{-1}磷酸二氢钠溶液调节 pH 至 7.0,再用生理盐水稀释制成含固形物 0.1% 的溶液)0.9 mL,置 37 ± 0.5 ℃恒温水浴中孵育 5 min,取各浓度标准品 0.1 mL,迅速加入试管中,立即计时并摇匀,观察纤维蛋白初凝时间,每种浓度测 5 次(5 次极差不得超过平均值 10%),调整标准品系列溶液浓度使凝结时间控制在 14 ~ 60 s。取待标品依法测定,用标准品 log 剂量(x)-log 初凝时间(y)绘制的标准曲线进行计算。

5　抗凝血酶Ⅲ因子、Xa 因子、Ⅱa 因子、S-2765 及 S-2238 分子量与氨基酸序列鉴别

分子量采用 MALDI-TOF 法进行分子量测定,以 α-氰基-4-羟基肉桂酸为基质,离子源加速电压 20 kV,紫外激光波长 355 nm,循环率 200 Hz,质量分辨率 1 500;底物氨基酸序列采用 Edman 降解法进行测定。

6　发色底物水解前后紫外-可见光谱扫描

分别取发色底物 S-2765,S-2238,加水稀释制成约 0.1 mmol·L^{-1}的溶液作为水解前待测液;取 7.1 nKat·mL^{-1} Xa 因子溶液或 10 IU·mL^{-1}Ⅱa 因子溶液各 300 μL,分别加入 300 μL 水解前 S-2765 或 S-2238 待测液中,混匀,作为水解后待测液,分别取水解前后待测溶液,在 200 ~ 600 nm 波长下扫描紫外吸收光谱。

7　发色底物 S-2765,S-2238 纯度、pNA 有关物质测定方法

取对硝基苯胺对照品适量,加流动相 A 溶解并

稀释制成浓度范围为 5×10^{-5} ~0.1 mg·mL^{-1}的系列对照品溶液。取发色底物 S-2765、S-2238 待标品,加流动相 A 溶解并稀释制成约 0.2 mg·mL^{-1}的溶液作为待标品溶液。色谱条件为:岛津 20－AD 高效液相色谱仪;色谱柱:Agela Technologies Venusil XBP RP C_{18}(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相 A:20% 乙腈溶液(含 0.1% 三氟醋酸),流动相 B:60% 乙腈溶液(含 0.1% 三氟醋酸);流速:1.0 mL·min^{-1};进样器温度:8 ℃;进样量:20 μL;检测波长:313 nm;梯度洗脱程序:0 ~20 min 流动相 B 从 12.5% 升至 50%;20 ~20.1 min 降回 12.5%,平衡 10 min。

8 米氏常数(*Km*)考察[8]

取人凝血酶标准品和待标Ⅱa 因子溶液,分别加 Tris 缓冲液(pH 8.4)配成浓度约为 0.005 IU·mL^{-1}的溶液作为Ⅱa 因子对照溶液和待标溶液;取进口 Xa 因子试剂和待标 Xa 因子,分别加 Tris 缓冲液(pH 8.4)配成浓度约为 0.4 nKat·mL^{-1}的溶液作为 Xa 因子对照溶液和待标溶液;分别取进口 S-2765 和待标 S-2765 试剂,加水溶解并稀释制成 0.01 ~1.0 mmol·L^{-1}浓度范围内的 8 个系列溶液分别作为底物 S-2765 对照溶液和待标溶液;分别取进口 S-2238 和待标 S-2238 试剂,加水溶解并稀释制成 6×10^{-2} ~9×10^{-4} mmol·L^{-1}浓度范围内的 8 个浓度的系列溶液分别作为底物 S-2238 对照溶液和待标溶液。取 96 孔板,向各孔中分别加入对照或待标系列底物溶液各 100 μL,37 ℃下孵育 2 min 后取出,于相应底物中分别加入对照或待标 Xa 因子或Ⅱa 因子各 100 μL,混匀,405 nm 波长下监测酶动力学曲线 10 min。

9 肝素抗 Xa 因子、抗Ⅱa 因子效价测定[9-10]

用 Tris(pH 8.4)缓冲液将肝素标准品稀释制成浓度范围为 0.005 ~0.1 IU·mL^{-1}的系列溶液 S1 ~4 和 T1 ~4,剂间比为 0.7(抗 Xa 因子)或 0.75(抗Ⅱa 因子),分别取 25 μL 加入 96 孔板内,同法采用 Tris(pH 8.4)溶液作为空白溶液,在样品溶液或空白溶液中依次加入等体积的 1 IU·mL^{-1}抗凝血酶Ⅲ(抗 Xa 因子)或 0.25 IU·mL^{-1}抗凝血酶Ⅲ(抗Ⅱa 因子)溶液后混匀,37 ℃保温 2 min,随后分别加入 50 μL Xa 因子或Ⅱa 因子溶液和 25 μL S-2765 或 S-2238 底物溶液,并分别在 37 ℃下反应 2 min。最后加入醋酸溶液终止反应后在 405 nm 波长下读取光吸收值,加入肝素的样品孔采用 4×4 量反应平行线法计算肝素效价。

结果与讨论

1 抗凝血酶效价与短期稳定性

用 BS2000 统计软件采用 4×4 量反应平行线法计算,5 支标准试剂的效价结果见表 1,5 支标准品的效价几何均值为 10.0 IU·支$^{-1}$,RSD 为 3.8%。5,10 d 短期稳定性样品结果分别为 9.9 IU·支$^{-1}$(n=3,RSD=3.2%)和 10.1 IU·支$^{-1}$(n=3,RSD=4.2%)。

表 1 抗凝血酶效价标定结果

样品编号	1	2	3	4	5	几何均值	RSD/%
效价/IU·支$^{-1}$	10.5	9.6	9.6	10.1	10.0	10.0	3.8
置信限率/%	10.0	5.4	8.5	3.0	9.7		

2 Xa 因子效价与短期稳定性

标准曲线:$\log C=(-2.346\times\log T)+3.365$,$r=-0.997$,5 支标准品的效价几何均值为 4.6 IU·支$^{-1}$($n$=5,RSD=1.8%),即 76.3 nKat·支$^{-1}$。5,10 d 短期稳定性样品结果分别为 4.7 IU·支$^{-1}$(n=3,RSD=1.4%)和 4.6 IU·支$^{-1}$(n=3,RSD=1.4%)。

3 Ⅱa 因子效价与短期稳定性

5 支样品测得效价几何均值为 38 IU·支$^{-1}$(n=10,RSD=1.8%)。因使用时为过量添加,为方便使用时稀释,赋值为 40 IU·支$^{-1}$。5,10 d 短期稳定性样品结果分别为 37 IU·支$^{-1}$(n=3,RSD=1.4%)和 38 IU·支$^{-1}$(n=3,RSD=1.4%)。

本研究采用牛源纤维蛋白原作为底物进行反应,分别与人源和牛源Ⅱa 因子进行反应,对 2 种来源Ⅱa 因子的凝结时间和凝结现象做了对比。结果表明,2 种来源的Ⅱa 因子凝结牛源纤维蛋白原底物时间差异不大[11]见表 2,但凝结现象和凝结物的外观有所不同。

表 2 人与牛来源Ⅱa因子凝结牛纤维蛋白原初凝结果比较表 $s, n=5$

初凝时间	Ⅱa因子来源	剂量/IU·mL^{-1}				标准曲线
		5.0	6.4	8.0	10.0	
$\bar{X}\pm CV$	人源	34±0.7	41±0.6	48±0.7	57±0.5	$y=-0.741\ 0x+2.276\ 7$ ($R^2=0.998$)
	牛源	34±0.6	42±0.5	49±0.5	58±0.4	$y=-0.749\ 5x+2.291\ 5$ ($R^2=0.996$)

4 抗凝血酶、Xa因子、Ⅱa因子分子量与氨基酸序列

抗凝血酶、Xa因子、Ⅱa因子分子量理论值分别为56,44和37 kDa,MALDI-TOF法测得的[M+H]$^+$分别为56 495,44 284和37 491 Da;S-2765和S-2238的理论分子量分别为714.6和625.6,[M+H]$^+$结果分别为642.8和554.3,理论分子量为625.6,2种底物结构中均有2个盐酸分子,计算值与理论值一致;S-2765和S-2238的理论结构式分别为N-α-Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA·2HCl和H-D-Phe-Pip-Arg-pNA·2HCl,Edman降解法氨基酸序列测定结果除S-2238的哌啶甲酸(pip)为非氨基酸外,其余氨基酸均与理论序列一致。

5 发色底物水解前后紫外-可见光吸收光谱

肝素与抗凝血酶Ⅲ结合后可封闭凝血因子的活性中心,未被封闭的凝血因子Xa或Ⅱa可将底物中的肽段水解,在405 nm波长处通过测定游离出的发色基团pNA的量可反推出肝素效价。因此考察水解前后的底物的紫外-可见光谱,可反映出水解前底物在405 nm波长处光吸收处是否有干扰,以及底物水解和pNA基团释放情况。

结果表明,水解前待标底物S-2765与S-2238的最大吸收波长均为(313.5±0.5) nm,405 nm波长处光吸收值分别为0.025和0.028,见图1;水解后的底物最大吸收波长为(380±1) nm,因此在测定波长405 nm下,未水解底物对pNA测定不产生干扰,见图2。

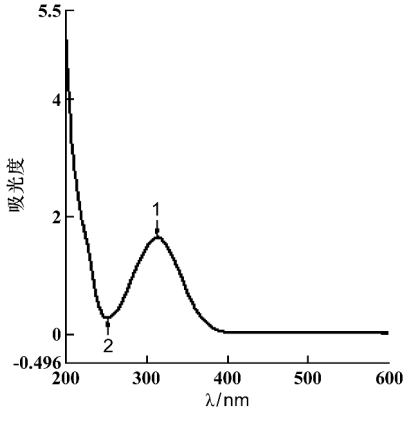


图 1 S-2238水解前紫外-可见光谱图

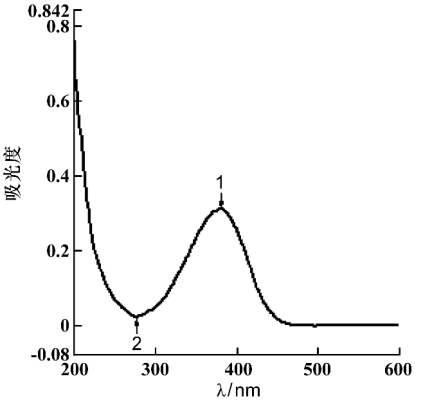


图 2 S-2238水解后紫外-可见光谱图

6 发色底物S-2765,S-2238的纯度、含量、游离pNA含量

肝素效价是根据水解底物后断裂下来的pNA基团的量计算得到的,因此游离pNA杂质含量是发色底物质量的最重要的影响因素,直接影响活性测定结果,需要对其进行控制。

按照$S/N=10$作为定量限,$S/N=3$作为检出限计算,215 nm波长下游离pNA的定量限与检出限分别为:0.25,0.075 μg·mL^{-1};313 nm波长下游离pNA的定量限与检出限分别为:7.6,2.3 ng·mL^{-1},最终选择313 nm作为测定波长,该波长条件下底物、pNA杂质和其他杂质均有都有较强吸收,且基线较为平稳(图3和图4)。在该检测条件下,pNA对照品在0.005~100 μg·mL^{-1}浓度范围内线性良好,$R^2=1.0$;加样回收率为98.5%~102.3%。

发色底物S-2765和S-2238纯度采用面积归一化法计算,纯度分别为99.0% ($n=5$),99.6% ($n=5$);含量采用质量平衡法计算,分别为96.2%和97.3%;pNA含量采用外标法计算,分别为0.17% ($n=5$)和0.02% ($n=5$);5,10 d短期稳定性样品纯度和pNA含量均未见改变。

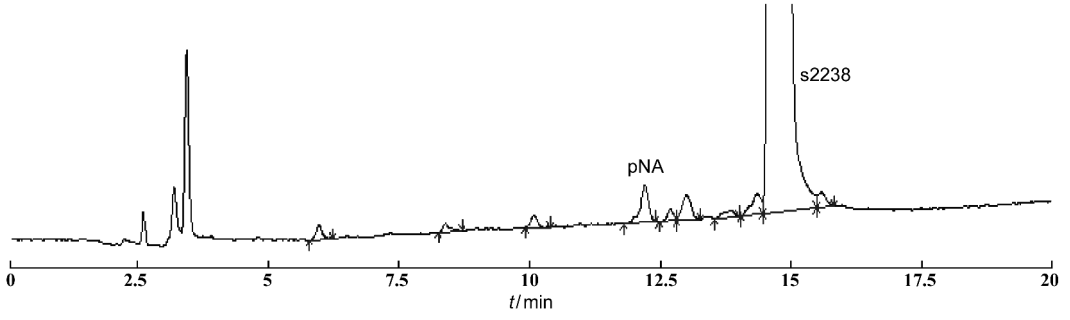


图 3 S-2238 纯度色谱图

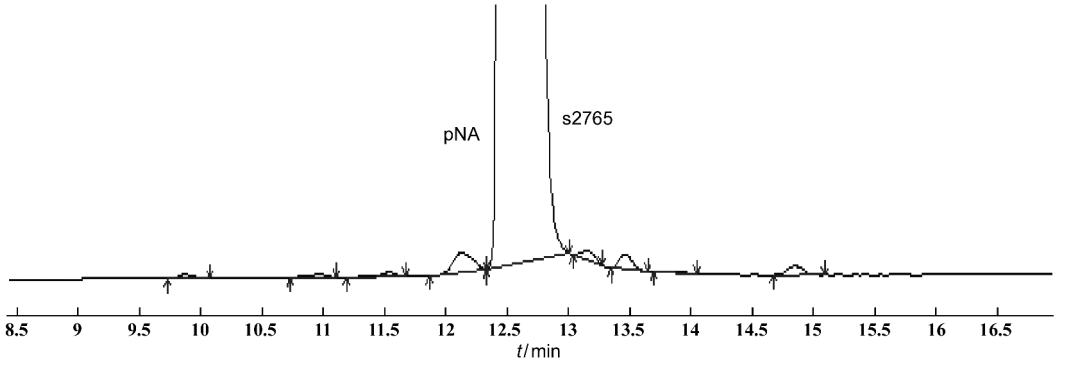


图 4 S-2765 纯度色谱图

7 发色底物 S-2765,S-2238 米氏常数(*Km* 值)测定

Km 等于酶促反应速度为最大反应速度一半时的底物浓度,当 pH、温度、离子强度等条件不变时,*Km* 值是恒定的,因此它可以表示酶和底物之间的亲和能力,*Km* 值越低亲和能力越强。

以时间为 x,每个浓度底物的吸光度为 y 分别得到各浓度底物下吸光度随时间变化的曲线(图 5),通过吸光度随时间的变化速率(斜率 k)与 pNA 消光系数(ε)的比值可计算得到反应速率(V);按照 Lineweaver Burk 双倒数作图法计算得到 *Km*(图 6)。

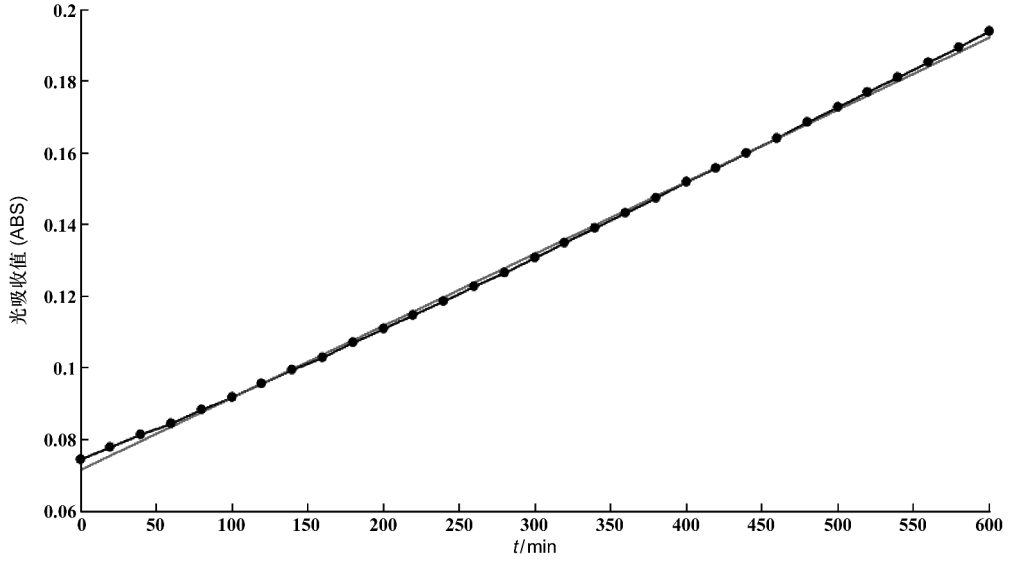


图 5 S-2765 与 Xa 因子酶动力学光谱图(底物浓度为 1 mmol·L^{-1})

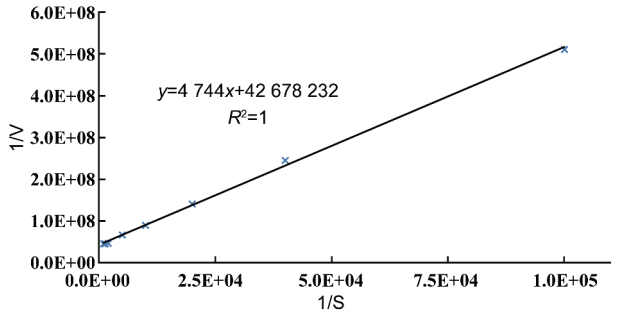


图 6 S-2765 Lineweaver Burk 图

表 3 分别列出了进口和标准 Xa 因子、Ⅱa 因子分别与进口、标准 S-2765,S-2238 底物得到的米氏常数。可见标准底物与进口底物米氏常数无显著差异,可满足实验需要;标准 Xa 因子与进口 Xa 因子与底物亲和能力相当;而标准Ⅱa 因子与进口试剂相比与底物亲和能力更强。

表 3 标准试剂与进口试剂米氏常数测定结果

$mol \cdot L^{-1}$, $n = 3$

底物类别		$\bar{X} \pm CV$	
		进口 Xa/Ⅱa 因子	标准 Xa/Ⅱa 因子
S-2765	进口	$(1.0 \pm 0.007) \times 10^{-4}$	$(1.2 \pm 0.010) \times 10^{-4}$
	标准	$(1.2 \pm 0.003) \times 10^{-4}$	$(1.6 \pm 0.006) \times 10^{-4}$
S-2238	进口	$(9.0 \pm 0.31) \times 10^{-6}$	$(4.3 \pm 0.24) \times 10^{-6}$
	标准	$(9.2 \pm 0.21) \times 10^{-6}$	$(4.6 \pm 0.22) \times 10^{-6}$

8 肝素抗 Xa 因子、抗Ⅱa 因子效价测定

分别采用进口试剂与标准试剂测定肝素国家标准品(抗 Xa 因子与抗Ⅱa 因子标示效价分别为 1 151 和 424 IU·支$^{-1}$),进口试剂测得结果 $\bar{X} \pm CV$ ($n = 5$)分别为(1 134 ± 31)和(447 ± 19) IU·支$^{-1}$,标准试剂测得结果 $\bar{X} \pm CV$($n = 4$)分别为(1 179 ± 44)和(430 ± 8) IU·支$^{-1}$,2 种试剂测定结果无显著性差异,标准试剂可以满足肝素效价测定需要。

讨　论

我国药典肝素效价方法修改之后,各生产企业对效价测定用试剂的需求量大大增加。从本文研究内容可见,目前我国标准试剂的质量完全可以满足肝素、低分子肝素类产品抗 Xa 因子和抗Ⅱa 因子效价的测定需求,而且与普通市售产品相比,标准试剂在活力赋值、稳定性监控方面也更加严格,因此其发放可以有效降低企业实验成本,规范实验操作,减少因试剂质量造成的实验问题,也为我国低分子肝素系列产品纳入《中华人民共和国药典》工作打下了基础。

[参 考 文 献]

[1] ONISHI A, ST ANGE K, DORDICK JS, *et al*. Heparin and anticoagulation[J]. *Front Biosci*, 2016, 21(7): 1372 - 1392.

[2] 冯昭龙,刘纯慧. 肝素前体 heparosan 的制备及药学应用研究进展[J]. 中国现代应用药学,2019,36(1):114 - 119.

[3] 杨涛,王春丽,刘音,等. 运用肝素酶血栓弹力图对等管腔容积肝素钠封管后凝血功能的评价[J]. 世界临床药物,2015,36(10):679 - 681,701.

[4] ROEMISCH J, GRAY E, HOFFMANN JN, *et al*. Antithrombin: a new look at the actions of a serine protease inhibitor[J]. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 2002, 13(8): 657 - 670.

[5] MARĆETIC S, ĐELAP I, DĚLI BRǨLJAÍ D, *et al*. Chromogenic anti-FXa assay calibrated with low molecular weight heparin in patients treated with rivaroxaban and apixaban: possibilities and limitations[J]. *Biochem Med (Zagreb)*, 2020, 30(1): 010702.

[6] HARRIS LF, CASTRO-LÓPEZ V, HAMMADI N, *et al*. Development of a fluorescent anti-factor Xa assay to monitor unfractionated and low molecular weight heparins[J]. *Talanta*, 2010, 81(4 - 5): 1725 - 1730.

[7] GRAY E, WALKER AD, HEATH AB. A collaborative study to establish the 2nd International standard for antithrombin concentrate[J]. *Thromb Haemost*, 1999, 82: 46 - 50.

[8] SHOJAEI F, HOMAEI A, TAHERIZADEH MR, *et al*. Characterization of biosynthesized chitosan nanoparticles from Penaeus vannamei for the immobilization of P. vannamei protease: an eco-friendly nanobiocatalyst[J]. *Int J Food Prop*, 2017, 20(Suppl 2): S1413 - S1423.

[9] 李京,范慧红. 微量生色底物法测定肝素钠抗 Xa 因子和抗Ⅱa 因子活性[J]. 中国生化药物杂志, 2010, 30(1): 45 - 47.

[10] CASTRO-LÓPEZ V, HARRIS LF, O'DONNELL JS, *et al*. Comparative study of factor Xa fluorogenic substrates and their influence on the quantification of LMWHs[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2011, 399(2): 691 - 700.

[11] 齐元麟,陈兵,刘广芬,等. 蕲蛇酶、凝血酶对人及牛纤维蛋白原的凝血反应比较[J]. 蛇志,2000,12(2):50 - 53.

编辑:刘卓越/接受日期:2020 - 02 - 22