

人凝血酶原复合物聚山梨酯80残留量测定方法验证研究

张忠祥 周章珍 孔华兵

国药集团贵州生物制药有限公司 贵州 凯里 556011

摘要: 本文旨在探讨人凝血酶原复合物(PCC)中聚山梨酯80(PS80)残留量的测定方法验证研究。首先,我们通过文献综述了解了PCC的制备过程以及PS80作为稳定剂在其中的作用。随后,我们采用了紫外可见分光光度计方法来准确测定PCC样品中的PS80残留量。为了验证所方法的准确性和可靠性,通过与已知浓度的PS80标准品进行比较,我们验证了方法的专属性、准确度、中间精密度的重复性、线性、耐用性、范围。此外,我们对PCC样品进行了分析,以确保方法的适用性。实验结果表明,所用的紫外可见分光光度计方法具有良好的线性关系、较高的精密度和准确度,且检出限低,能够满足PCC中PS80残留量的测定要求。我们还探讨了PS80残留量对PCC疗效和安全性的可能影响,为血液制品质量控制提供了科学依据。

关键词: 人凝血酶原复合物;聚山梨酯80;残留量测定;紫外可见分光光度计方法;应用研究

1 引言

1.1 研究背景和意义:

人凝血酶原复合物用于治疗出血性疾病的血液制品。而作为其生产过程中的辅料,聚山梨酯80是一种乙氧基化脂肪醇,可能在生产过程中残留在制剂中,对患者健康产生潜在危害。因此,准确测定人凝血酶原复合物中聚山梨酯80的残留量对保证药物质量和患者安全具有重要意义。

1.2 研究目的和意义

本研究旨在采用准确可靠的方法,以验证测定人凝血酶原复合物中聚山梨酯80的残留量方法可行性,并探讨其在应用中的意义。通过该研究,可以为药品生产企业提供技术支持,确保产品质量,同时有助于监督药品生产和质量控制。

2 人凝血酶原复合物中聚山梨酯80残留的潜在风险

在人凝血酶原复合物制剂的生产过程中,聚山梨酯80作为辅料添加,可能存在残留量。残留的聚山梨酯80可能引起过敏反应、毒性累积等问题,因此需要建立可靠的检测方法来验证和监测残留量,以确保人凝血酶原复合物制剂的质量和安全性。

3 聚山梨酯80残留量测定方法的验证

3.1 样品制备

3.1.1 标准系列制备:分别取聚山梨酯80对照品溶液(1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$)0 μl 、10 μl 、25 μl 、50 μl 、75 μl 、100 μl ,加入预先加入1ml水的离心管中混匀。

3.1.2 供试品处理:取人凝血酶原复合物按标示量用灭菌注射用水进行复溶,即规格为300IU(15ml)/瓶,则每瓶加入灭菌注射用水15ml复溶。取复溶液1.0ml于离心

管中,加5.0ml乙醇-氯化钠溶液,摇匀,以每分钟3000转离心10分钟,将上清液缓慢倒入离心管中,再用1.0ml乙醇-氯化钠溶液轻轻洗涤管壁,洗液与上清液合并,以每分钟3000转离心10分钟,设置温度55 $^{\circ}\text{C}$,用样品浓缩仪将上清液浓缩至0.1~0.5ml,加1ml水溶解。

3.2 测定法

3.2.1 试验操作:将标准系列与供试品每管加入2.0ml二氯甲烷,3ml硫氰钴铵溶液,混匀,室温下放置1.5小时,期间每15分钟振摇1次,再静置0.5小时。以二氯甲烷作空白对照,用紫外可见分光光度计在波长620nm处测定下层二氯甲烷液吸光度值。

3.2.2 检验数据处理:用标准系列聚山梨酯80浓度($\mu\text{g}/\text{ml}$)对吸光度值作直线回归。相关系数 r 应不低于0.98,否则试验不成立。将供试品吸光度值代入回归方程计算聚山梨酯80残留量。

3.3 试液配制

3.3.1 聚山梨酯80对照品溶液(1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$):取聚山梨酯80约100mg,精密称定,加水溶解后置100ml量瓶中,加水稀释至刻度。

3.3.2 乙醇-氯化钠溶液:取乙醇200mL,加入氯化钠搅拌溶解至饱和。

3.3.3 硫氰钴铵溶液:取硝酸钴5g,硫氰酸铵100g,于烧杯中加入约200mL纯化水完全溶解后转入500mL容量瓶中,用纯化水洗涤烧杯,洗液并入容量瓶中,加水稀释至刻度,混匀。

3.4 设备/材料/验证项目

3.4.1 验证设备:样品浓缩仪、离心机、紫外可见分光光度计、电子天平等。

3.4.2 验证材料：乙醇，氯化钠，硝酸钴，硫氰酸铵，二氯甲烷，灭菌注射用水，聚山梨酯80，人凝血酶原复合物(规格300IU(15mL/瓶)，国药集团贵州生物制药有限公司)。

3.4.3 验证项目及要

1) 线性：分别取聚山梨酯80对照品溶液(1000μg/ml) 0μl、10μl、25μl、50μl、75μl、100μl，加入预先加入1ml水的离心管中混匀，作为供试液进行测定，用标准聚山梨酯80浓度(μg/ml)对吸光度值作直线回归，计算相关系数R。相关系数R应 ≥ 0.98。

2) 专属性：取复溶后的人凝血酶原复合物记为溶液A；取0.5ml聚山梨酯80对照品溶液(1000μg/ml)加入5ml溶液A中，即聚山梨酯80理论加入浓度为100μg/ml，记为溶液B。以溶液A和溶液B作为供试液，分别重复测定3次，计算回收率。回收率应在95%~105%。

3) 准确度：分别取聚山梨酯80对照品溶液10μl、50μl、100μl加入预先加入1ml水的离心管中混匀，作为供试液，每一浓度做两管平行，分别测定，计算回收率。回收率应在95%~105%。

4) 中间精密度：由甲乙两位分析人员分别对人凝血酶原复合物进行聚山梨酯80残留量测定，每天各测定一次，测定6天。取共12次测定结果计算RSD值，并进行方差分析，对人员和日期两因素进行F检验。RSD应 ≤ 10%；人员和日期两因素在α = 0.05水平上均对方法精密度无显著性影响(P > 0.05)。

5) 重复性：重复测定人凝血酶原复合物的聚山梨酯80残留量六次，计算六次结果的RSD值。RSD应 ≤ 10%。

6) 耐用性：将3.2测定法中的“室温(10~30℃)下放置1.5小时”条件分别改为“温度为10~20℃下放置1.5小时”和“温度为20~30℃下放置1.5小时”，由同一操作人员且其他测定条件不变分别进行人凝血酶原复合物聚山梨酯80残留量测定，每个温度条件下测定3个平行样品，计算6次结果的RSD值。RSD应 ≤ 10%。

7) 范围：实验结果应满足线性，重复性，中间精密度，准确度确认项目要求，其线性确认中稀释度的上限和下限为该方法的范围。

3.5 方法验证结果

3.5.1 线性

用标准聚山梨酯80浓度(μg/ml)对吸光度值作直线回归，使用EXCEL软件进行结果统计，结果见图1。线性方程为Y = 0.00084X - 0.0108，相关系数R = 0.9855，符合直线回归相关系数R应 ≥ 0.98要求。

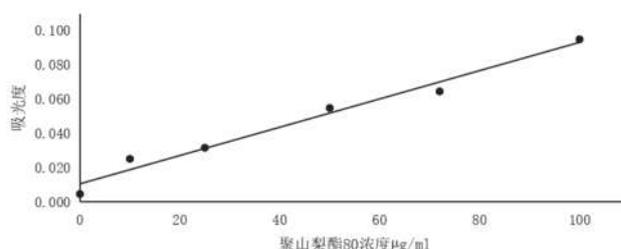


图1 标准曲线图

3.5.2 专属性

专属性确认结果如表1所示，回收率结果均在95%~105%范围内。

表1 专属性结果

测定次数	溶液 A(μg/ml)	溶液 B(μg/ml)	聚山梨酯80理论加入浓度(μg/ml)	回收率	平均回收率
1	44	143		99%	
2	44	142	100	98%	98%
3	44	142		98%	

3.5.3 准确度

准确度确认结果如表2所示，各浓度水平回收率均在95%~105%范围内，符合要求。

表2 准确度结果

加入聚山梨酯80对照品溶液量	样品编号	结果(μg/mL)	平均值(μg/mL)	回收率	回收率平均值
10μg/mL	1	9.90	10.06	101%	
	2	10.22			
50μg/mL	1	49.99	49.91	100%	100%
	2	49.83			
100μg/mL	1	98.48	98.40	98%	
	2	98.32			

3.5.4 中间精密度

中间精密度确认结果如表2所示，12个检测结果统计RSD ≤ 10%，且经F检验得出人员和日期两因素在α = 0.05水平上均对方法精密度无显著性影响(P > 0.05)，中间精密度良好。

表3 中间精密度结果

实验人员	检验天数	结果(μg/mL)	RSD	F值(人员因素)	F值(日期因素)	结果p值(α = 0.05)
甲	1	43	2.0%	0.86	0.36	0.62
	2	44				
	3	45				
	4	45				
	5	44				
	6	45				

续表:

实验 人员	检验 天数	结果 ($\mu\text{g/mL}$)	RSD	F值 (人员 因素)	F值 (日期 因素)	结果 p 值 ($\alpha = 0.05$)
乙	1	45	2.0%	0.86	0.36	0.62
	2	45				
	3	46				
	4	45				
	5	44				
	6	43				

3.5.5 重复性

重复性确认结果见表4, 聚山梨酯80残留量六次检测结果为2%, 重复性良好, 符合 $\text{RSD} \leq 10\%$ 的要求。

表4 重复性结果

样品编号	结果($\mu\text{g/mL}$)	平均值($\mu\text{g/mL}$)	标准差	RSD
1	43	42	0.81650	2%
2	41			
3	42			
4	42			
5	43			
6	43			

3.5.6 耐用性

耐用性确认结果见表5.6次结果 RSD 为3%, 符合 $\text{RSD} \leq 10\%$ 要求。

表5 耐用性结果

环境温度	样品 编号	结果 ($\mu\text{g/mL}$)	平均值 ($\mu\text{g/mL}$)	平均值 ($\mu\text{g/mL}$)	SD	RSD
10 ~ 20 $^{\circ}\text{C}$	1	42	42	43	1.09545	3%
	2	42				
	3	42				
20 ~ 30 $^{\circ}\text{C}$	1	44	44			
	2	44				
	3	44				

3.5.7 范围

实验结果满足线性, 重复性, 中间精密度, 准确度确认项目要求, 其线性确认中稀释度的上限和下限为该方法的范围, 为10 ~ 100 $\mu\text{g/mL}$ 。

3.6 方法验证结论: 在此次确认中, 线性符合 $R \geq 0.98$ 的要求; 精密度(重复性 $\text{RSD} \leq 10\%$ 、中间精密度: $\text{RSD} \leq 10\%$; 经F检验后, 不同操作人员、不同时间之间在 $\alpha = 0.05$ 水平上对该检验方法无显著性影响(P

> 0.05); 准确度的回收率符合在95% ~ 105%的要求, 范围为10 ~ 100 $\mu\text{g/mL}$ 。该方法范围上限包含人凝血酶原复合物的质量标准(《中国药典》2020年版 三部中规定人凝血酶原复合物应不高于100 $\mu\text{g/mL}$)上限, 确认的10 ~ 100 $\mu\text{g/mL}$ 范围适用。

4 结论与展望

4.1 结论

本论文对人凝血酶原复合物中聚山梨酯80残留量的测定方法进行了验证研究。通过实验验证, 确认了一种准确、可靠的测定方法, 并成功应用于人凝血酶原复合物产品中聚山梨酯80残留的检测。为人凝血酶原复合物产品质量控制提供了有效的技术支持。

4.2 存在问题和未来展望:

目前存在一些问题需要进一步解决。例如, 当前测定方法在某些条件下的灵敏度还有待提高, 同时也需要更广泛的样本验证以确保方法的稳定性和准确性。未来的研究应该着重于优化测定方法, 提高测定的精确度和灵敏度, 以适应不同生产环境和产品类型的需要。

4.3 进一步研究方向建议:

基于当前研究结果和存在的问题, 可以提出以下进一步研究方向建议:

- 探索新的分析技术和方法, 提高测定方法的灵敏度和准确性。

- 扩大样本数据量, 增加实验验证的广度和深度。

- 研究影响测定方法准确性的因素, 寻找方法改进的空间。

- 探索人凝血酶原复合物产品中其他可能存在的污染物, 完善相关检测方法。

通过进一步的研究, 将有助于不断提升人凝血酶原复合物产品质量的检测技术水平, 为相关领域的质量控制工作提供更多有效的技术支持。

参考文献

[1] 王晓丽, 李明, 赵海燕. 人凝血酶原复合物中聚山梨酯80残留量的高效液相色谱-质谱联用法[J]. 中国生物制品学杂志, 2019, 31(5): 456-460.

[2] 李娜, 王海英, 刘洪波. 人凝血酶原复合物中聚山梨酯80残留量的检测技术研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2021, 19(3): 237-241.