DOI:10.13748/j.cnki.issn1007-7693.1993.01.006

凝固酶试验测定金葡素*注射液的活性

方家驹 程传芬
(浙江医科大学杭州分校，杭州 310012)

谢旭明 王 江
(杭州市第三人民医院，杭州 310009)

摘要 金葡素(骨折愈合刺激素)系金黄色葡萄球菌代谢产物经一系列处理后制成生物制品。本文应用凝固酶试验和凝固蛋白质含量测定方法制订金葡素质控指标。规定每1 ml 金葡素 产生的凝固蛋白量不低于150μg为合格产品。

关键词 骨折愈合刺激素 凝固蛋白 凝固酶

金葡素(又名骨折愈合刺激素)系金黄色葡萄球菌代谢产物经一系列处理后制成的生物制品。经省内外二十余所医院千余例不同类型骨折患者临床治疗证实本制剂确能促进新鲜骨折愈合，对延迟愈合和不愈合的骨折也有促使其愈合的功效，总治愈率达90%以上。临床实践证明本品是治愈骨折较为理想的制剂[1-3]。

金葡素是能产生凝固酶(Staphylocoglase)的金黄色葡萄球菌代谢产物和液体培养基的混合物。经生化分析其成分含有凝固酶、多胺、鸟氨酸及蛋白质等，其功效为促进骨折端的血肿凝固、纤维蛋白及胶原蛋白的形成、吸收和机化，加速毛细血管的重建，从而加速骨骼和骨组织的新陈代谢[3-4]。

实验证明金葡素并非某单一成份具有促进骨折愈合作用，凝固酶、鸟氨酸、多胺等成份均是促进骨折愈合的有效成份，金葡素的作用可能是各种有效成份协同作用的结果。用高温高压或加入抑制剂等方法使金葡素制剂中凝固酶活力丧失制成不含活性凝固酶的金葡素制剂，与未经处理的金葡素制剂在动物骨折疗效实验中进行比较观察，结果证明凝固酶确有促进骨痂生长的效果。由于凝固酶定性和定量方法较成熟、稳定，经多年实验探索后我们选用凝固酶定性和定量试验作为金葡素制剂质量控制指标。

材料和方法

试剂

蛋白质标准液(100 μg/ml)：

准确称取蛋白质标准品(中国药品生物制品检定所产品) 100 mg，用生理盐水溶解并稀释至1 L。

NaOH浓度为0.05 mol/L。

碱性铜试剂：

甲液：称取 Na_2CO_3 2 g 溶于100 ml 0.1 mol/L NaOH 中。

乙液：称取 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.5 g 溶于100 ml 1%酒石酸钾溶液中。

应用时将甲液和乙液按50:1混合。

酚试剂：

于1500 ml 圆底烧瓶内加入钨酸钠($NaWO_4 \cdot 2H_2O$)100 g，钼酸钠($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)25 g，蒸馏水700 ml，85%磷酸50 ml及浓HCl 100 ml，用软木塞装置冷凝器于

* 编者注：1992年12月卫生部新药评审目录中为"高聚金葡素"。

(C)1994-2024 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

圆底烧瓶上，慢慢加热，回流10 h。再加硫酸锂150 g及水50 ml。如溶液显绿色，可加溴数滴至溶液呈淡黄色，然后煮沸除去多余的溴，冷却后将溶液稀释至1000 ml，此为贮存液，宜贮存于暗处。应用时以等量蒸馏水稀释之。

凝固酶定性反应

新鲜稀释兔血浆：取健康兔一只，从心脏采血，以3.8%柠檬酸钠为抗凝剂，离心后所得兔血浆按1:3用生理盐水稀释。

取试管三支编号，于1号试管中加1 ml稀释兔血浆及1 ml金葡素混匀为测定管，于2号试管中加1 ml稀释兔血浆和1 ml生理盐水混匀为空白管，于3号试管中加1 ml稀释兔血浆和1 ml培养基混匀为对照管。三支试管同置37℃水浴保温6 h。

上述实验均在无菌条件下进行，实验结果在黑色背景下用肉眼或在放大镜下仔细观察测定管有无白色块状絮凝现象产生。

凝固蛋白质含量测定

样品液准备：

将产生白色块状絮凝蛋白质的测定管离心分离(3500转/min，20 min)。白色块状絮凝沉积在管壁，小心弃去上清液，用1 ml生理盐水将沉淀洗涤两次后，小心抽干，然后加0.05 mol/L NaOH 5 ml使其溶解并转移至10 ml容量瓶中，准确定容至10 ml，即为样品液。

凝固蛋白质测定：

取样品液1.6 ml，加碱性铜试剂4.0 ml，室温放置15 min，再加酚试剂0.4 ml，室温放置30 min，然后在波长660 nm处比色，读取吸光度值，从蛋白质标准曲线求得样品液中凝固蛋白质含量(M)[7]。

计算：

$$凝固蛋白质含量(M)=\frac{\Sigma M}{n}\times\frac{10}{1.6}\mu g/ml$$

n为平行测定管数 $\Sigma M=M_1+M_2+\cdots+M_n$

结果与讨论

凝固酶活力测定方法是根据Tager和Hales的方法加以改进的[5-6]。凝固酶定性反应结果为：加金葡素1 ml的测定管经保温6 h后用肉眼可见白色纤维蛋白凝块，而对照管及空白管均无此现象产生。在测定凝固蛋白质时必须注意：(1)兔血浆须用柠檬酸钠抗凝，在分离血浆时必须排除血小板干扰。(2)本法测定的凝固蛋白质量甚微，操作尤需小心，每次测定时需作三管以上平行测定管，管间测定误差应小于15%，否则需重新复核。(3)比较不同批号制剂凝固蛋白质含量或者复核同一批号测定结果时，必须用相同的稀释兔血浆，否则会影响实验结果的可比性。用本法对同一批号金葡素先后重复测定三次，每次作三个平行测定管，测定结果表明测定误差均在10%以下(表1)，本法灵敏度是较为可靠的。

暂行质量标准规定金葡素中凝固酶合格标准的实验根据。根据多次实验所获数据(表2)，我们在暂行质量标准中规定"1 ml金葡素作用于1 ml稀释兔血浆产生的凝固蛋白质含量不低于150 μg为合格。"金葡素在2—8℃冰箱中储存一年以上，经凝固酶定性试验、凝固蛋白质含量测定、pH、无菌和热原等项目检查均符合要求(表3)。

最近谢旭明等报导了一种应用锝一亚甲基二磷酸动态三时相骨显象的金葡素家兔检定法。作者应用放射性核素及γ—照相先进技术对家兔实验性骨折作骨痂血流、血池、延迟相时间等测定，其结果作为金葡素的质量指标。这种生物检定法具有测试方法先进，灵敏度高等优点，适用于科学研究，但生物检定法实验条件要求高，目前难于在工厂推广，所以凝固酶试验作为金葡素质量控制指标仍然具有现实意义。

(C)1994-2024 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表1　金葡素三批重复测定结果

制剂批号	测定日期	M(μg/ml)	$\overline{M}$(μg/ml)	σ	CV
		319			
	91.5.7	340	330	11	3.3%
		331			
		314			
910206	91.5 9	336	326	11	3.5%
		329			
		319			
	91.5.10	327	318	9	2.8%
		309			
		400			
	91.5.7	363	378	20	5.3%
		370			
		372			
910227	91.5.9	319	342	27	7.9%
		336			
		351			
	91.5.10	327	331	18	5.4%
		315			
		309			
	91.5.7	325	307	19	6.2%
		288			
		325			
910309	91.5.9	295	306	16	5.3%
		300			
		306			
	91.5.10	313	294	27	9.2%
		263			

表2　金葡素凝固蛋白质含量测定结果

制剂批号	凝固酶定性试验	凝固蛋白质含量 (μg/ml)
870614	卅	385
881203	卅	454
881208	卅	428
890809　890823	卅	215
890815	卅	362
900330	卅	344
900921	卅	180
910206	卅	318
910227	卅	331

表3　金葡素贮存期稳定性观察

制剂批号	870614	881208	881203	890815
贮存时间	46月	28月	28月	20月
性　状	淡黄澄明液体	淡黄澄明液体	淡黄澄明液体	淡黄澄明液体
pH	6.78	6.65	6.61	6.45
凝固酶定性试验	卅	卅	卅	卅
凝固蛋白质含量 (μg/ml)	312	350	340	310

(C)1994-2024 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

小　结

金葡素系金黄色葡萄球菌代谢产物经一系列处理后制成的生物制品，临床实践证明金葡素是治疗骨折较为理想的制剂。金葡素含有凝固酶、多胺、鸟氨酸及蛋白质等成份，金葡素的作用可能是各种有效成份协同作用的结果。

本文详述了作为金葡素质量控制指标的凝固酶定性试验和凝固蛋白质含量测定方法，并制定金葡素中凝固酶合格标准为："金葡素1 ml产生凝固蛋白量不低于150μg为合格产品"。

参考文献

1 谢旭明等. 骨折愈合刺激素的临床疗效观察. 中华外科杂志，1983，21(10):584

2 谢旭明等. 骨折愈合刺激素的动物实验研究. 中华外科杂志，1982，20(10):600

3 谢旭明等. 骨折愈合刺激素治疗关节囊内骨折临床观察. 中国骨伤，1992，5(4):30

4 王祖武等. 骨折愈合时软骨的形成和作用. 中华外科杂志，1983，21(10):600

5 Duthie E. S. et al. Purification of Free Staphylococcal Coagulase, Biochem. J. 1958, 70:125

6 Deneke A.and Blobel H. Fibrinogen Media for Studies on Staphylococci, J Bacterio 1962, 83(4):533

7 Lowry O. H. et al. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent, J. Biol. Chem. 1951, 193:265

Determination of Fracture Healing Stimulin Injection Activity by Assay of Coagulase

Fang Jiaju, Cheng Chuanfen

(Hangzhou Branch of Zhejiang Medical University, Hangzhou 310012)

Xie Xuming, Wang Jiang

(The Third People's Hospital of Hangzhou, Hangzhou 310009)

Abstract Fracture Healing Stimulin (FHS), a preparation from the metabolic product of *Staphylococcus aureus*, is a kind of new medicine for fractures. Coagulase test and determination of clotting protein can be used in quality control of FHS. As a qualified product, the clotting protein produced by per millilitre of FHS injection must be no less than 150 micrograms.

Key words Fracture Healing Stimulin　clotting protein　coagulase

收稿日期：1992—09—15

(C)1994-2024 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net