

1208 肝素生物测定法

本法系用于肝素类产品的效价测定。测定方法分为抗 II a 因子/抗 Xa 因子效价测定法和凝血时间测定法，凝血时间测定法又分为兔全血法、血浆复钙法、APTT 法。

抗 II a 因子/抗 Xa 因子效价测定法

本法系通过微量显色法比较肝素标准品与供试品抗 II a 因子和抗 Xa 因子的活性，以测定供试品的效价。

抗 II a 因子测定法

试剂 (1) 三羟甲基氨基甲烷-聚乙二醇 6000 缓冲液 (pH8.4) 取三羟甲基氨基甲烷 6.06g，氯化钠 10.23g，乙二胺四醋酸二钠 2.8g，聚乙二醇 6000 1.0g，加水 800ml 使溶解，用盐酸调节 pH 值至 8.4，用水稀释至 1000ml。

(2) 抗凝血酶溶液 取抗凝血酶 (ATIII)，加三羟甲基氨基甲烷-聚乙二醇 6000 缓冲液 (pH8.4) 溶解并稀释制成每 1ml 中含抗凝血酶 0.25IU 的溶液。

(3) 凝血酶溶液 取凝血酶 (F II a)，加三羟甲基氨基甲烷-聚乙二醇 6000 缓冲液 (pH8.4) 溶解并稀释制成每 1ml 中约含 5IU 的溶液，调整浓度使其在以三羟甲基氨基甲烷-聚乙二醇 6000 缓冲液 (pH8.4) 代替肝素作为空白溶液 (B₁、B₂) 的抗 II a 因子实验中，在 405nm 波长处的吸光度值在 0.8~1.0。

(4) 发色底物溶液 取发色底物 S-2238(或其他 F II a 特异性发色底物)，加水制成 0.003mol/L 的溶液，临用前用水稀释至 0.625mmol/L。

标准品溶液与稀释液的制备 试验当日，取肝素标准品，复溶后制成标准品溶液。取标准品溶液适量，加三羟甲基氨基甲烷-聚乙二醇 6000 缓冲液 (pH8.4) 分别稀释制成 4 个不同浓度的溶液。该浓度应在 log 剂量-反应的线性范围内，一般为每 1ml 中含 0.0085~0.035IU，相邻两浓度之比值 (r) 应相同。

供试品溶液与稀释液的制备 除另有规定外，按供试品的标示量或估计效价 (A_T)，用三羟甲基氨基甲烷-聚乙二醇 6000 缓冲液 (pH8.4)，照标准品溶液与稀释液的制备法制成 4 个不同浓度的溶液，相邻两浓度之比值 (r) 应与标准品相等，供试品与标准品各剂量组的反应值应相近。

测定法 取不同浓度的标准品 (S) 系列溶液或供试品 (T) 系列溶液及上

述缓冲液 (B)，按 B₁、S₁、S₂、S₃、S₄、T₁、T₂、T₃、T₄、T₁、T₂、T₃、T₄、S₁、S₂、S₃、S₄、B₂ 的顺序依次向各小管中分别精密加入 20~100 μ l 相同体积 (V) 的上述溶液；每管精密加入相同体积 (V) 的抗凝血酶溶液，混匀，37 $^{\circ}$ C 平衡 2 分钟；再精密加入凝血酶溶液适量 (2V)，混匀，37 $^{\circ}$ C 平衡 2 分钟；再精密加入发色底物溶液适量 (2V)，混匀，37 $^{\circ}$ C 准确保温 2 分钟后，再精密加入 50% 醋酸溶液适量 (2V) 终止反应后，迅速冷却至室温。用适宜设备在 405nm 的波长处测定各管吸光度。B₁、B₂ 两管的吸光度不得有显著性差异。以吸光度为纵坐标，标准品系列溶液 (或供试品系列溶液) 浓度的对数值为横坐标分别作线性回归，按生物检定统计法 (中国药典 2015 年版通则 1431) 中的量反应平行线原理 4 \times 4 法实验设计，计算效价及实验误差。

本法的可信限率 (FL%) 不得大于 10%。

抗 Xa 因子测定法

试剂 (1) 三羟甲基氨基甲烷-聚乙二醇 6000 缓冲液 (pH8.4) 照抗 IIa 因子项下配制。

(2) 抗凝血酶溶液 取抗凝血酶 (ATIII)，加三羟甲基氨基甲烷-聚乙二醇 6000 缓冲液 (pH8.4) 溶解并稀释制成每 1ml 中含抗凝血酶 1IU 的溶液。

(3) Xa 因子溶液 取 Xa 因子 (FXa)，加三羟甲基氨基甲烷-聚乙二醇 6000 缓冲液 (pH8.4) 溶解并稀释制成每 1ml 中约含 0.4IU (或 7.1 μ kat) 的溶液，调整浓度使其在以三羟甲基氨基甲烷-聚乙二醇 6000 缓冲液 (pH8.4) 代替肝素作为空白溶液 (B₁、B₂) 的抗 Xa 因子实验中，在 405nm 波长处的吸光度值在 0.8~1.0。

(4) 发色底物溶液 取发色底物 S-2765 (或其他 FXa 特异性发色底物)，加水制成 0.003mol/L 的溶液，临用前用水稀释至 1mmol/L。

标准品溶液与稀释液的制备 试验当日，取肝素标准品，复溶后制成标准品溶液。取标准品溶液适量，加三羟甲基氨基甲烷-聚乙二醇 6000 缓冲液 (pH8.4) 分别稀释制成 4 个不同浓度的溶液。该浓度应在 log 剂量-反应的线性范围内，一般为每 1ml 中含 0.035 IU~0.15IU，相邻两浓度之比值 (r) 应相同。

供试品溶液与稀释液的制备 除另有规定外，按供试品的标示量或估计效

价 (A_T)，照标准品溶液与稀释液的制备法制成 4 个不同浓度的溶液，相邻两浓度之比值 (r) 应与标准品相等，供试品与标准品各剂量组的反应值应相近。

测定法 取不同浓度的标准品 (S) 系列溶液或供试品 (T) 系列溶液及上述缓冲液 (B)，按 B_1 、 S_1 、 S_2 、 S_3 、 S_4 、 T_1 、 T_2 、 T_3 、 T_4 、 T_1 、 T_2 、 T_3 、 T_4 、 S_1 、 S_2 、 S_3 、 S_4 、 B_2 的顺序依次向各小管中分别精密加入 20~100 μ l 相同体积 (V) 的上述溶液；每管精密加入相同体积 (V) 的抗凝血酶溶液，混匀，37℃ 平衡 2 分钟；再精密加入 Xa 因子溶液适量 (2V)，混匀，37℃ 平衡 2 分钟；再精密加入发色底物溶液适量 (2V)，混匀，37℃ 准确保温 2 分钟后，再各精密加入 50% 醋酸溶液适量 (2V) 终止反应后，迅速冷却至室温。用适宜设备在 405nm 的波长处测定各管吸光度。 B_1 、 B_2 两管的吸光度不得有显著性差异。以吸光度为纵坐标，标准品系列溶液 (或供试品系列溶液) 浓度的对数值为横坐标分别作线性回归，按生物检定统计法 (中国药典 2015 年版通则 1431) 中的量反应平行线原理 4 \times 4 法实验设计，计算效价及实验误差。

本法的可信限率 (FL%) 不得大于 10%。

凝血时间测定法

本法系比较肝素标准品 (S) 与供试品 (T) 延长新鲜兔血或兔、猪血浆凝结时间的作用，以测定供试品的效价。

标准品溶液的制备 精密称取肝素标准品适量，按标示效价加灭菌注射用水溶解使成每 1ml 中含 100 单位的溶液，分装于适宜的容器内，4~8℃ 贮存，经验证保持活性符合要求的条件下，可在 3 个月内使用。

标准品稀释液的制备 试验当日，精密量取标准品溶液，按高、中、低剂量组 (ds_3 、 ds_2 、 ds_1) 用氯化钠注射液配制成 3 种浓度的稀释液，相邻两浓度的比值 (r) 应相等；调节剂量使低剂量组各管的平均凝结时间较不加肝素对照管明显延长，一般以大于 1.5 倍空白血浆的凝结时间为宜。高剂量组各管的平均凝结时间，用兔全血法者，以不超过 60 分钟为宜，其稀释液一般可制成 1ml 中含肝素 2~5 单位， r 为 1:0.7 左右；用血浆复钙法者，以不超过 30 分钟为宜，其稀释液一般可制成每 1ml 中含肝素 0.5~1.5 单位， r 为 1:0.85 左右，用活化部分凝血活酶时间测定法 (APTT 法) 者，一般以不超过 90 秒为宜，其稀释液浓度一般可

制成每 1ml 含肝素 0.4~1.7 单位, r 为 1:0.85 左右, 可根据实验情况调整。

供试品溶液与稀释液的制备 按供试品的标示量或估计效价 (A_T), 照标准品溶液与稀释液的制备法制成高、中、低 (dT_3 、 dT_2 、 dT_1) 3 种浓度的稀释液。相邻两浓度之比值 (r) 应与标准品相等, 供试品与标准品各剂量组的凝结时间应相近。

血浆的制备 迅速收集兔或猪血置预先放有 109mmol/L 枸橼酸钠溶液的容器中, 枸橼酸钠溶液与血液容积比为 1:9, 边收集边轻轻振摇, 混匀, 室温下 1500 ×g 离心不少于 15 分钟 (g 为重力常数)。立即吸出血浆, 并分成若干份分装于适宜容器内, 低温冻结贮存。临用时置 $37^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$ 水浴中融化, 用两层纱布或快速滤纸过滤, 使用过程中在 $4\sim 8^\circ\text{C}$ 放置。血浆复钙法可使用兔或猪血浆; APTT 法使用兔血浆。

测定法

~~(1)~~ **兔全血法** 取管径均匀 ($0.8\text{cm} \times 3.8\text{cm}$ 或 $1.0\text{cm} \times 7.5\text{cm}$)、清洁干燥的小试管若干支, 每管加入一种浓度的标准品或供试品稀释液 0.1ml, 每种浓度不得少于 3 管, 各浓度的试管支数相等。取刚抽出的兔血适量, 分别注入小试管内, 每管 0.9ml, 立即混匀, 避免产生气泡, 并开始计算时间。将小试管置于 $37^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$ 恒温水浴中, 从动物采血时起至小试管放入恒温水浴的时间不得超过 3 分钟, 注意观察并记录各管的凝结时间。

本法的可信限率 (FL%) 不得大于 10%。

~~(2)~~ **血浆复钙法** 取上述规格的小试管若干支, 分别加入血浆一定量, 置 $37^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$ 恒温水浴中 5~10 分钟后, 一次每管加入一种浓度的标准品或供试品稀释液及 1%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, 血浆、肝素稀释液和氯化钙溶液的加入量分别为 0.5ml、0.4ml 和 0.1ml, 或 0.8ml、0.1ml 和 0.1ml, 加入 1%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。

本法的可信限率 (FL%) 不得大于 5%。

~~(3)~~ **APTT 法** 取血液凝聚凝血分析仪样品杯若干, 每管一次加入血浆 50 μl , 一种浓度的标准品或供试品稀释液 50 μl 、APTT 试剂 50 μl , 混匀, 应避免产生气泡。 $37^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$ 预温 180 秒后, 每管再加入 CaCl_2 试剂 50 μl , 然后立即

用血液凝固凝血分析仪测定凝结时间，即活化部分凝血活酶时间（APTT）。标准品或供试品稀释液每个浓度的测定次数不得少于 3 次，各浓度的测定次数应相同。测定时，血浆、标准品或供试品稀释液、APTT 试剂、CaCl₂ 试剂的加入比例和预温时间可根据仪器或试剂的说明书适当调整。测定顺序以保证标准品和供试品测定的平行性为原则，应尽量保证相同浓度的标准品和供试品稀释液的测定时间接近。将上述方法测得的凝结时间换算成对数，照生物检定统计法（通则 1431）中的量反应平行线测定法计算效价及实验误差。

本法的可信限率（FL%）不得大于 10%。