

附件：通则3519 人凝血因子IX效价测定法

3519 人凝血因子IX效价测定法

第一法（一期法）

本法系依据人凝血因子IX能缩短人凝血因子IX缺乏血浆凝固时间的原理，以人凝血因子IX缺乏血浆为基质血浆，将含有人凝血因子IX的标准品或供试品及活化部分凝血活酶（activated partial thromboplastin time, APTT）试剂与其混合后，加入钙离子启动凝固反应，利用血浆凝固时间长短测定供试品中人凝血因子IX的效价。

试剂（1）枸橼酸钠溶液 称取枸橼酸钠 10.83g，加水溶解并稀释至 250ml。

（2）咪唑缓冲液 取咪唑0.68g和氯化钠1.17g，加水溶解并稀释至100ml，加0.1mol/L 盐酸溶液42.2ml，用水稀释至200ml（pH7.3）。

（3）稀释液 分别取枸橼酸钠溶液和咪唑缓冲液适量（1:5，v/v）混匀，加20%人血白蛋白溶液适量，制成1%人血白蛋白溶液。

（4）APTT 试剂

（5）人凝血因子IX缺乏血浆 人凝血因子IX含量低于 1%的人血浆或人工基质血浆。

（6）氯化钙溶液 取氯化钙 147g，加水溶解并稀释至 1000ml。用前用水稀释20 倍，制成0.05mol/L 氯化钙溶液。

标准品溶液 临用新制。取人凝血酶原复合物标准品 1 支，照说明书复溶，用人凝血因子IX缺乏血浆或 0.9%氯化钠溶液稀释制成每 1ml 含人凝血因子IX 1IU 的溶液，作为标准品贮备液。取标准品贮备液，用稀释液稀释制成3个不同浓度的标准品溶液，相邻两浓度之比值（r）应相等（如制成每1ml 中含0.1 IU、0.05 IU 和0.025 IU 的溶液），置冰浴待用。

供试品溶液 临用新制。取供试品 1 瓶，照说明书复溶（若供试品中含有肝素，复溶后用硫酸鱼精蛋白中和）。用人凝血因子IX缺乏血浆或 0.9%氯化钠溶液稀释制成每 1ml 约含人凝血因子IX 1IU 的溶液，作为供试品贮备液。取供试品贮备液，用稀释液稀释制成与标准品溶液 3 个浓度一致的供试品溶液，置冰浴待用。

测定法 取APTT试剂 0.1ml，置37℃保温一定时间（一般4 分钟），加入人凝血因子IX缺乏血浆0.1ml和标准品溶液0.1ml，混匀，置37℃保温一定时间（一般5 分钟），加入已预热至 37℃的0.05mol/L 氯化钙溶液0.1ml，记录凝固时间。

用不同浓度的供试品溶液 0.1ml 替代标准品溶液，同法操作。

以系列标准品溶液（或系列供试品溶液）效价（IU/ml）的对数对其相应的凝固时间（秒）的对数作线性回归，照生物检定统计法（通则 1431）中的量反应平行线测定法（3.3）法计算供试品效价及 95%置信区间，其 95%置信区间应在测得效价的 80%~125%。供试品溶液和标准品溶液的剂量反应曲线相关系数均应不低于0.98，回归项应非常显著（ $P < 0.01$ ），偏离平行和偏离线性均应不显著（ $P \geq 0.01$ ）。

【附注】(1) 自“用人凝血因子IX缺乏血浆或 0.9%氯化钠溶液稀释制成每 1ml 含人凝血因子IX 1IU 的溶液”起，依法操作，独立制备 2 份系列标准品溶液和供试品溶液，平行测定。同一稀释度两份溶液的凝固时间之差不得超过均值 10%，否则重测。

(2) 直接与标准品、供试品和血浆接触的器皿应为塑料制品或硅化玻璃制品。

(3) 如采用全自动凝血仪操作，按仪器使用说明书进行。

(4) 偏离线性项变异的差方和与自由度（ f ）计算公式：
$$\text{（偏离线性）} = \text{差方和（二次曲线）} + \text{差方和（反向二次曲线）}$$

$$f \text{（偏离线性）} = f \text{（二次曲线）} + f \text{（反向二次曲线）}$$

第二法 生色底物法

本法系依据人凝血因子IX（FIX）经凝血因子XIa 等适宜试剂激活后，在钙离子和磷脂的存在下，辅助活化的凝血因子VIII（FVIIIa）激活凝血因子X（FX）使成为活化的凝血因子Xa（FXa），FXa 可作用于生色底物使其释放对硝基苯胺。对硝基苯胺的生成量或生成速率的对数与FIX效价的对数在一定范围内存在线性关系，测定对硝基苯胺在405nm 波长的吸光度值可计算供试品中 FIX 的效价。

试剂 采用经验证的人凝血因子IX检测试剂盒，并按试剂盒说明书配制试剂。

标准品溶液 临用新制。取人凝血酶原复合物标准品 1 支，照说明书复溶后，用稀释缓冲液稀释并制成每 1ml 中含人凝血因子IX 3 个不同浓度的标准品溶液，相邻两浓度之比值（ r ）应相等（如制成每 1ml 中含 0.003125 IU、0.0015625 IU 和 0.00078125 IU 的溶液）。

供试品溶液 临用新制。取供试品 1 瓶，照说明书复溶后，用稀释缓冲液稀释并制成与标准品溶液 3 个浓度一致的供试品溶液。

测定法 在96孔板中分别精密加入上述不同浓度的标准品溶液或供试品溶液50 μ l，置37℃保温3~4 分钟；精密加入已预热至 37℃的因子试剂溶液 50 μ l，

混匀，置 37℃ 反应 2 分钟；再精密加入已预热至 37℃ 的活化试剂溶液 50 μl，混匀置 37℃ 反应 3 分钟；最后精密加入已预热至 37℃ 的生色底物溶液 50 μl，置 37℃ 准确反应 2 分钟。用适宜设备（酶标仪或全自动血凝仪）在 405nm 的波长处记录线性反应阶段的吸光度值变化速率（动力学法，如 10~100 秒）；也可采用终点法，即准确反应 2 分钟后精密加入 2% 枸橼酸溶液 50 μl 终止反应，以稀释缓冲液 50 μl 自“置 37℃ 保温 3~4 分钟”起，同法操作，作为空白，在 405nm 的波长处测定各孔吸光度值。

以系列标准品溶液（或系列供试品溶液）效价（IU/ml）的对数对其相应的吸光度值变化速率（动力学法）或吸光度值（终点法）的对数作线性回归，照生物检定统计法（通则 1431）中的量反应平行线测定法（3.3）法计算每 1ml 人凝血因子 IX 效价。根据标示装量计算每瓶供试品效价及 95% 置信区间，其 95% 置信区间应在测得效价的 80%~125%。供试品溶液和标准品溶液的剂量反应曲线相关系数均不应低于 0.98，回归项应非常显著（ $P < 0.01$ ），偏离平行和偏离线性均不应不显著（ $P \geq 0.01$ ）。

【附注】（1）自“用稀释缓冲液稀释并制成每 1ml 中含人凝血因子 IX 3 个不同浓度的溶液”起，依法操作，独立制备 2 份系列标准品溶液和供试品溶液，平行测定。

（2）试剂预热时间不宜超过 15 分钟。

（3）本法中数据拟合模型也可选用半对数回归量反应平行线法（即响应值不作对数转换）或斜率比法。应根据选择的拟合模型，将标准品溶液和供试品溶液剂量范围经验证后作适当调整。

（4）本法也可使用其他经验证等效的生色底物法检测试剂盒。试剂盒的验证可参照生物制品生物活性/效价测定方法验证指导原则（通则 9401），应至少包括相对准确度、精密度和范围等内容。相对准确度应满足相对偏倚在 ±10% 范围内，线性回归方程的相关系数应不低于 0.98；精密度应满足 $GCV \leq 10\%$ ；相对准确度以及精密度符合要求的效价水平范围应涵盖效价限度范围。

（5）如采用全自动凝血仪操作，按仪器使用说明书进行。

（6）偏离线性项变异的差方和与自由度（ f ）计算公式：同第一法**【附注】**（4）项下的公式。

（7）如采用终点法，以稀释缓冲液 50 μl 替代标准品溶液或供试品溶液，自“置 37℃ 保温 3~4 分钟”起，同法操作，作为空白孔。

起草单位： 广东省药品检验所

联系方式：020-81848209

修订说明

本通则主要用于检测人凝血因子IX或人凝血酶原复合物中人凝血因子IX效价。

本次公示标准由广东省药品检验所起草，四川省药品检验研究院和上海市食品药品检验研究院复核。与原通则标准相比，主要增修订情况如下：

- 1、增订了第二法——生色底物法。
- 2、将效价计算方法由标曲代入法修订为量反应平行线法，并增加了系统适用性要求。
- 3、将一期法所用试剂按照中国药典试药，规范描述。
- 4、按药典体例对文字进行了规范。