

附件： 人凝血因子VIII国家标准草案修订公示稿

项目	2020年版《中国药典》	拟修订
3.3.4 效价	3.3.4 效价 依法测定（通则 3521），根据每 1ml 人凝血因子VIII效价及标示装量计算每瓶人凝血因子VIII效价，应为标示量的 80%~140%。	3.3.4 效价 依法测定（通则 3521 <u>第一法</u> ），根据每 1ml 人凝血因子VIII效价及标示装量计算每瓶人凝血因子VIII效价，应为标示量的 80%~140%， <u>其 95%置信区间应在测得效价的 80%~120%。</u>

起草单位： 上海市食品药品检验研究院
联系方式： 021—50798176

3521 人凝血因子VIII效价测定法(一期法)

第一法 一期法

本法系依据人凝血因子VIII能缩短人凝血因子VIII缺乏血浆凝固时间的原理，以人凝血因子VIII缺乏血浆为基质血浆，将含有人凝血因子VIII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VIII的效价。

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

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

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。

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

APTT 试剂

氯化钙溶液 取氯化钙($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 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。取人凝血因子VIII标准品 1 支，照说明书复溶，用人凝血因子VIII缺乏血浆或 0.9%氯化钠溶液稀释制

成每 1ml 含人凝血因子VIII 1IU 的溶液，作为标准品贮备液。按生物检定统计法（通则 1431）中的量反应平行线测定法（3.3）法进行实验，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、0.05IU 和 0.025IU 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，用人凝血因子VIII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VIII 1IU 的溶液，作为供试品贮备液。按生物检定统计法（通则 1431）中的量反应平行线测定法（3.3）法进行实验，取供试品贮备液，用稀释液稀释制成 3 个不同浓度的供试品溶液，相邻两浓度之比值（ r ）应与标准品溶液比值相等（如制成每 1ml 中含 0.1IU、0.05IU 和 0.025IU 的溶液），置冰浴待用。

测定法 取 APTT 试剂 0.1ml，置血凝杯中，置 37℃保温一定时间（一般 4 分钟），加凝血因子VIII缺乏血浆 0.1ml 和标准品溶液 0.1ml，混匀，置 37℃水浴中保温一定时间（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。供试品溶液和标准品溶液的剂量反应曲

线回归项应非常显著 ($P < 0.01$), 偏离平行和偏离线性均应不显著 ($P \geq 0.01$)。

【附注】(1) 直线回归相关系数应不低于 0.98。自“用人凝血因子VIII缺乏血浆或 0.9% 氯化钠溶液稀释制成每 1ml 含人凝血因子VIII 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) 如采用全自动血凝仪操作, 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:

差方和_(偏离线性) = 差方和_(二次曲线) + 差方和_(反向二次曲线)

$f_{(偏离线性)} = f_{(二次曲线)} + f_{(反向二次曲线)}$

第二法 生色底物法

本法系依据人凝血因子VIII (FVIII) 经凝血酶等适宜试剂激活后, 在钙离子和磷脂的存在下, 辅助活化的凝血因子IX (FIXa) 激活凝血因子X (FX) 为活化的凝血因子Xa (FXa), FXa 可作用于发色底物使其释放对硝基苯胺, 在 405 nm 波长条件下通过吸光度值计算其生成量, 从而测定供试品中 FVIII 的效价。

试剂 采用经验证的人凝血因子VIII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。取人凝血因子VIII标准品 1 支，照说明书复溶后，用试剂盒中稀释缓冲液稀释并制成每 1ml 含人凝血因子VIII 1IU 的溶液，作为标准品贮备液。按生物检定统计法（通则 1431）中的量反应平行线测定法（3.3）法进行实验设计，取标准品贮备液，用稀释缓冲液制成 3 个不同浓度的标准品溶液（S），相邻两浓度之比值（r）应相同（如制成每 1ml 中含 0.0125 IU、0.00625IU 和 0.003125IU 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，用试剂盒中稀释缓冲液稀释并制成每 1ml 约含凝血因子VIII 1IU 的溶液。按生物检定统计法（通则 1431）中的量反应平行线测定法（3.3）法进行实验设计，用稀释缓冲液制成 3 个不同浓度的供试品溶液（T），相邻两浓度溶液之比值（r）应与标准品溶液之比值相同（如制成每 1ml 中含 0.0125 IU、0.00625IU 和 0.003125IU 的溶液）。

测定法 取不同浓度的标准品溶液（S）或供试品溶液（T），按 S₁、S₂、S₃、T₁、T₂、T₃、T₁、T₂、T₃、S₁、S₂、S₃ 的顺序依次向 96 孔板中分别精密加入上述溶液 50 μl，以稀释缓冲液（B）50 μl 作为空白，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 μl，混匀，置 37℃ 中准确反应 2 分钟；再精密加入已预热至 37℃ 的生色底物溶液 50 μl，准确反应 2 分钟。用适宜设备（酶标仪或全自动血凝仪）在 405nm 的波长处记录反应 30~120 秒的吸光度值变化速率（动力学法）；也可采用终点

法,即准确反应 2 分钟后精密加入 20%醋酸溶液 50 μ l 终止反应,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)法计算效价及 95%置信区间。供试品溶液和标准品溶液的剂量反应曲线回归项应非常显著($P < 0.01$),偏离平行和偏离线性均应不显著($P \geq 0.01$)。

【附注】(1)自“用试剂盒中稀释缓冲液稀释并制成每 1ml 含人凝血因子VIII 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。

(2)空白孔应满足试剂盒的系统适用性要求。

(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 $\pm 10\%$ 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) 如采用全自动血凝仪操作，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。

起草单位： 上海市食品药品检验研究院
联系方式： 021—50798176

国家药典委员会