

T/CSBM

团 体 标 准

T/CSBM 0047—2024

医疗器械表面肝素抗 Xa/IIa 因子活性和含量试验方法

Test method for anti-Xa/IIa activity and content of medical device surface heparin

2024 - 05 - 14 发布

2024 - 10 - 01 实施

目 次

前言	II
引言	III
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 总则	1
5 试验方法	1
6 报告	3
参考文献	4

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由中国生物材料学会提出。

本文件由中国生物材料学会团体标准化技术委员会归口。

本文件起草单位：江苏百赛飞生物科技有限公司、百因特表界面检验检测技术（苏州）有限公司、四川大学、四川医疗器械生物材料和制品检验中心有限公司、山东省医疗器械和药品包装检验研究院、苏州大学、苏州工业园区生物材料表界面工程研究院。

本文件主要起草人：李丹、陈益平、梁洁、袁暎、刘成虎、方菁崑、陈红。

引 言

血液接触类器械是指在使用过程中会与人体血液发生直接接触的医疗器械，例如血管通路产品（留置针套管、中心静脉导管等）、体外生命支持产品（血液透析器、膜式氧合器等）、心血管植入产品（心脏支架、人工血管、心脏瓣膜等）等。血液接触类医疗器械应用面临生物相容性及血液相容性两大问题。与血液接触的医疗器械会激发宿主防御机制，特别是血液稳定机制，从而级联引起血栓和栓塞的发生，危及患者生命。肝素抗凝效果优良，但临床应用途径多为静脉注射，但这会导致许多副作用，如引起自发性出血、多器官功能障碍及血小板减少等，且不能达到持续抗凝的目的。因此对血液接触类医疗器械进行表面肝素涂层改性，提高其血液相容性，是解决上述问题的重要途径。

对于肝素抗凝涂层，其表面覆盖的肝素量，以及涂覆到器械表面的肝素药物活性保留，均会影响其功能性的实现。然而，国内带肝素抗凝涂层医疗器械的研究和发展刚刚起步，对于医疗器械表面肝素抗Xa/IIa因子活性和含量试验方法的评价研究十分匮乏，尚没有适用的检测标准及监管措施，企业之间缺乏统一和规范的检测评价方法，不利于带肝素涂层器械的良性发展。因此，建立医疗器械表面肝素抗Xa/IIa因子活性和含量试验方法的检测标准十分必要，有助于规范和监督医疗器械涂层市场的健康持续发展，最终推动整个医疗器械行业和人类健康产业的高品质发展。

医疗器械表面肝素抗 Xa/ II a 因子活性和含量试验方法

1 范围

本文件规定了带肝素抗凝涂层医疗器械表面肝素抗Xa/ II a因子活性和含量试验的总则、试验方法和报告。

本文件适用于通过一定的方式结合在器械表面的含有肝素成分的涂层,其他肝素涂层种类亦可参照使用。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中,注日期的引用文件,仅该日期对应的版本适用于本文件;不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

中华人民共和国药典(2020年版 四部)(国家药监局 国家卫生健康委 2020年第78号)

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

肝素涂层 heparin coating

通过一定方式涂覆或结合在器械表面的含有肝素成分的涂层。

3.2

抗 Xa/ II a 因子活性 anti-Xa/ II a activity

器械表面的肝素结合抗凝血酶III(AT III)抑制Xa/ II a因子活性的能力,用IU来表示。

3.3

肝素含量 heparin content

结合在器械表面上的肝素含量,用重量单位表示,如 μg 。

4 总则

结合在器械表面上肝素涂层的抗Xa/ II a因子活性和含量是发挥其抗凝血功能的重要影响因素,本文件提供了用于表征带肝素涂层医疗器械表面肝素抗Xa/ II a因子活性和肝素含量的检测方法,其中抗Xa/ II a因子活性是基于AT III和肝素所形成的肝素-AT III复合物抑制Xa/ II a因子活性的能力。肝素含量测试方法有两种,分别为甲苯胺蓝法和MBTH法。

5 试验方法

5.1 抗 Xa/ II a 因子活性

5.1.1 原理

肝素与AT-III形成复合物，抑制过量添加的Xa/IIa因子的活性，发色底物与剩余Xa/IIa因子特异性结合，水解释放对硝基苯胺（pNA），在405 nm处的吸光度与反应体系中的肝素浓度成反比。

5.1.2 试验步骤

5.1.2.1 标准曲线的制作

使用按照《中华人民共和国药典》（2020年版 四部）配置的pH为8.4的三羟甲基氨基甲烷-聚乙二醇6 000缓冲液配置不同浓度的肝素钠标准溶液，加入抗凝血酶溶液使肝素钠浓度在0 IU/mL~3 IU/mL范围内，然后加入Xa/IIa因子溶液和发色底物溶液，37 °C孵育2 min~20 min后，加入醋酸溶液终止反应，立即测量反应液在405 nm处的吸光度值，以肝素钠浓度的对数值为横坐标，吸光度值为纵坐标绘制标准曲线，采用线性方程进行拟合。

5.1.2.2 试验样品测试

取样品置于试管中，参照5.1.2.1步骤，将样品的吸光度值带入标准曲线，计算得到样品的肝素浓度。

5.1.3 结果分析

按式（1）计算样品肝素抗Xa/IIa因子活性总量（ Q_1 ）：

$$Q_1 = C \times V \dots\dots\dots (1)$$

式中：

Q_1 ——样品肝素抗 Xa/IIa 因子活性总量，单位为 IU；

C ——样品肝素浓度，单位为 IU/mL；

V ——缓冲液体积，单位为mL。

5.2 肝素含量

5.2.1 方法一

5.2.1.1 原理

肝素在水溶液中由于其酸性基团的解离而高度带负电荷，甲苯胺蓝和肝素钠在水溶液中会发生静电结合，未被结合的甲苯胺蓝在最大吸收波长处的吸光度与肝素钠浓度呈线性关系。

5.2.1.2 试验步骤

5.2.1.2.1 标准曲线制作

将肝素钠用生理盐水或PBS缓冲液在0 μg/mL~30 μg/mL范围内配置成不同浓度的标准溶液，然后加入甲苯胺蓝溶液（0.002%~0.0002%，w/v），室温下孵育3 min~10 min后测定甲苯胺蓝最大吸收波长处的吸光度值。以肝素浓度为横坐标，吸光度为纵坐标制作标准曲线，采用线性方程进行拟合。

5.2.1.2.2 试验样品测试

取带肝素涂层和无涂层的同种材料样品置于试管中，然后参照5.2.1.2.1步骤，将测试的吸光度值带入标准曲线，计算得到样品的肝素浓度。应进行无涂层的同种材料样品测试，扣除背景材料影响。

5.2.2 方法二

5.2.2.1 原理

在酸性条件下,利用亚硝酸钠的强氧化性降解涂层中的肝素分子使其氨基己糖结构脱氨并产生醛基,然后加入3-甲基-2-苯并噻唑酮腈(MBTH)与之发生化学反应,最后产生具有蓝色的MBTH偶联物,反应液最大吸收波长处的吸光度与肝素钠浓度呈线性关系。

5.2.2.2 试验步骤

5.2.2.2.1 标准曲线制作

将肝素钠用生理盐水或PBS缓冲液在 $0\mu\text{g}/\text{mL}\sim 100\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内配置成不同浓度的标准溶液,加入等体积的亚硝酸钠溶液和乙酸溶液 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 反应 60 min 以上,然后依次加入等体积的氨基磺酸铵溶液、MBTH和氯化铁溶液后,测试在 $628\text{ nm}\sim 632\text{ nm}$ 处的吸光度。以肝素浓度为横坐标,吸光度为纵坐标制作标准曲线,采用线性方程进行拟合。

5.2.2.2.2 试验样品测试

取带肝素涂层和无涂层的同种材料样品置于试管中,然后参照5.2.2.2.1步骤,将测试的吸光度值带入标准曲线,计算得到样品的肝素浓度。应进行无涂层的同种材料样品测试,扣除背景材料影响。

5.2.3 结果分析

按式(2)计算样品表面肝素含量(Q_2):

$$Q_2 = (c_1 - c_0) \times v \dots\dots\dots (2)$$

式中:

Q_2 ——肝素含量,单位为 μg ;

c_0 ——无涂层样品背景浓度,单位为 $\mu\text{g}/\text{mL}$;

c_1 ——涂层样品肝素浓度,单位为 $\mu\text{g}/\text{mL}$;

v ——溶剂体积,单位为 mL ;

注:以重量单位表示肝素含量旨在客观定量描述涂层化学组成,并非关联肝素活性或抗凝性能。

6 报告

试验报告应包括但不限于以下内容:

- a) 样品的识别;
- b) 样品制备方法;
- c) 测试方法;
- d) 测试条件;
- e) 测试结果。

参 考 文 献

[1] Hurst R E, Settine J M .An accurate colorimetric method for measurement of sulfaminohexose in heparins and heparan sulfates[J].Analytical Biochemistry, 1981, 115(1):88-92. DOI:10.1016/0003-2697(81)90528-5.

全国团体标准信息平台