

А. Л. Берковский, Е. В. Сергеева, А. В. Суворов

ТЕСТИРОВАНИЕ АКТИВНОСТИ НЕФРАКЦИОНИРОВАННОГО ГЕПАРИНА В ПРЕПАРАТАХ И СУБСТАНЦИЯХ

ФГБУ "Гематологический научный центр" МЗ РФ, Россия, 125167, Москва;
e-mail: aron_56@mail.ru

В настоящее время актуальным является развитие эффективного производства препаратов нефракционированного гепарина (НФГ), широко применяемых в клинической практике. Система обеспечения качества получения фармацевтических препаратов по руководствам ВОЗ требует, в частности, применения специфических и избирательных методов контроля активности гепарина в препаратах и субстанциях. На основании созданной тест-системы разработан клоттинговый метод для измерения активности НФГ в его препаратах и субстанциях по рекомендуемому Государственной фармакопеей Российской Федерации коагулологическому методу. Метод был оценен по основным аналитическим характеристикам. Доказана сопоставимость результатов, полученных разработанным тестом, с таковыми при определении активности НФГ хромогенным методом, рекомендуемым Государственной и Европейской фармакопеями. Установленные правильность, чувствительность и воспроизводимость позволяют рекомендовать валидированный коагулологический метод и созданную тест-систему для внедрения в контроль производства НФГ.

Ключевые слова: нефракционированный гепарин; коагулологические методы; тест-системы; АЧТВ-реагенты; контроль производства.

Гепарин представляет собой гетерогенную смесь сульфатированных полисахаридных цепей с повторяющимися единицами D-глюкозамина, L-идурановой или глюкуроновой кислот. Антикоагулянтная активность гепарина обусловлена его способностью повышать скорость инактивации сериновых протеаз, участвующих в свертывании крови, под действием антитромбина III. Гепарин изменяет конформационное состояние активного центра и увеличивает ингибирующую способность антитромбина III относительно тромбина (в 1000–5000 раз), факторов IXa, Xa, XIa и XIIa свертывания крови. Гетерогенность состава нефракционированного гепарина (НФГ) определяется наличием фракций с высоким (33 %) и низким сродством к антитромбину III [1–3].

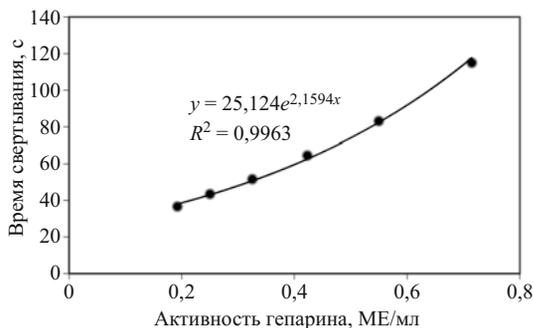
В настоящее время препараты НФГ в клинической практике частично заменяются низкомолекулярным гепарином по многим показаниям, однако НФГ остается антикоагулянтом выбора при различных заболеваниях. НФГ широко используется для профилактики и лечения тромбозов коронарных, легочных и периферических сосудов, при гиперкоагуляционной стадии синдрома внутрисосудистого диссеминированного свертывания, при применении искусственного кровообращения и гемодиализа [4–6].

Широкое клиническое применение НФГ обуславливает необходимость масштабного производства его готовых лекарственных форм, что в настоящее время в РФ и происходит. Эффективность процесса производства НФГ требует контроля его функциональной активности в исходном сырье, полупродуктах (субстанциях) и конечных препаратах НФГ. При этом современная система обеспечения качества производства предъявляет соответствующие требования к определению биологически активных веществ в субстанциях и готовых лекарственных формах.

Согласно руководствам ВОЗ, Государственной фармакопее РФ и Европейской фармакопее к таким требованиям относятся выбор специфических и избирательных ме-

тодов измерения, аттестация и чистота компонентов используемых тест-систем, аналитическая валидация применяемой методики по ряду характеристик (правильность, точность, воспроизводимость, межфлаконная вариация и др.) [7–10].

В процессе промышленного получения НФГ принципиальное значение имеет метод контроля производства по измерению активности НФГ в его препаратах и субстанциях. В настоящее время на ряде российских предприятий все еще используют ручной метод определения по времени рекальцификации плазмы. Однако этот тест имеет ряд существенных недостатков, а именно: отсутствие возможности автоматизации, большая погрешность определения и повышенный расход реагентов. Эти проблемы обуславливают актуальность и значимость введения в практику производства НФГ теста, лишенного указанных недостатков. До 2015 г. Европейская фармакопея 8.0. рекомендовала измерение гепарина в препаратах и субстанциях коагулологическим методом с использованием овечьей плазмы и АЧТВ-реагента на основе кефалина и каолина [7]. Однако необходимо иметь в виду, что проведенные клинико-лабораторные исследования свойств АЧТВ-теста при мониторинге введения НФГ показали высокую вариабельность получаемых результатов, обусловленную различной чувствительностью применяемых реагентов к гепарину [8, 11–14]. В 2015 г. Европейская Фармакопея 8.3. [10], возможно, учитывая указанные погрешности коагулологических методов, предложила оценивать активность гепарина по измерению его антитромбиновой (анти-IIa) активности хромогенным методом. Государственная фармакопея РФ издания 2015 г. рекомендует применение как клоттингового теста, выполняемого с помощью АЧТВ-реагента и нормальной плазмы крови человека, так и хромогенного метода [9]. Учитывая законодательную обязательность Государственной фармакопеей РФ, целью настоящей работы являлась разработка и валидация клоттингового метода



Зависимость времени свертывания от активности НФГ в разведениях международного стандарта. По оси абсцисс — активность НФГ, МЕ/мл, по оси ординат — время свертывания, с.

на основе теста АЧТВ для определения активности НФГ в его препаратах и субстанциях. Оценку указанной аналитической системы проводили также сравнением результатов, получаемых разработанным методом, с результатами хромогенного способа измерения анти-Ха активности гепарина.

Экспериментальная часть

В работе использовали 6-й Международный стандарт НФГ Unfractionated Heparin International Standard 07/328 с активностью 2145 МЕ/ампулу и препарат НФГ производства Б. Браун Мельзунген АГ с активностью 5000 МЕ/мл. Для проведения теста применяли реагент, в состав которого входили кефалин, полученный из ткани мозга кролика, и каолин (Fluka). Содержание кефалина и каолина в реагенте составляло 0,1 и 1,5 г/л, соответственно. Реагент разливали по 2 мл и лиофилизировали в присутствии стабилизатора (бычий сывороточный альбумин) и наполнителя (глицин). В качестве субстрата при измерении НФГ применяли пулированную плазму крови человека, полученную от 20 здоровых доноров (нормальная плазма), стабилизированную цитратом натрия, забуференную 50 мМ раствором HEPES и лиофилизированную. Реакцию инициировали 25 мМ раствором хлорида кальция. Определение коагулологической активности гепарина проводили на механическом полуавтоматическом 4-канальном коагулометре KC4Delta (TCoag, Ирландия), а анти-Ха активности — хромогенным методом на автоматическом анализаторе ACL Elite Pro производства IL, США.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Microsoft Excel. Нижний предел аналитической чувствительности метода количественно оценивали по требованиям ГОСТ Р 53022.2–2008 [15]. Межфлаконную вариацию активности НФГ в рабочем стандартном образце (PCO) НФГ оценивали по относительному “межфасовочному” стандартному отклонению [16].

Проведение теста. В ячейку коагулометра добавляли 50 мкл нормальной плазмы, 50 мкл раствора стандартного образца НФГ или 50 мкл испытуемой пробы, или 50 мкл физиологического раствора (холостая проба), 50 мкл рабочего раствора реагента и инкубировали при 37 °С в течение 2–3 мин. Свертывание вызывали добавлением 50 мкл 25 мМ раствора хлорида кальция. Фиксировали время от момента добавления кальция до момен-

та образования сгустка. Время формирования сгустка в холостой пробе составляло 25–40 с.

Связь между временем свертывания, определяемым с помощью разработанного клоттингового метода, и активностью НФГ в 6-м Международном стандарте НФГ представлена на рисунке.

Измерение активности НФГ в испытуемых пробах проводили по калибровочному графику, построенному с помощью PCO НФГ с аттестованным по международному стандарту значением определяемого показателя.

PCO НФГ. Для обеспечения контроля производства препаратов НФГ с помощью предлагаемого метода нами был получен PCO НФГ с аттестованным по международному стандарту значением активности НФГ. Препарат НФГ производства Б. Браун Мельзунген АГ разводили Трис-НСI буфером, содержащим 0,15 М NaCl и 1 % альбумина, до концентрации, приблизительно равной 2 МЕ/мл, разливали в флаконы по 1 мл, лиофилизировали и реконструировали дистиллированной водой перед его аттестацией в качестве PCO. С помощью указанного буфера разводили 6-й международный стандарт НФГ до концентрации 2,145 МЕ/мл и готовили 5 последовательных его разведений с шагом 1,3. Параллельно аналогичным образом готовили такие же разведения PCO. В тесте определяли время свертывания каждого разведения международного стандарта и PCO НФГ. На основании полученных с международным стандартом данных строили калибровочный график зависимости времени свертывания от активности НФГ (рисунок) и по нему определяли активность НФГ в PCO с учетом степени разведения. Аттестованная таким образом активность НФГ в PCO была равна 2,148 МЕ/мл со стандартным отклонением 0,09 МЕ/мл; коэффициент вариации составлял 4,19 %. Полученный PCO использовали для построения калибровочного графика при измерении активности НФГ в тестируемых препаратах и субстанциях.

Валидация разработанного аналитического метода. Оценку аналитических характеристик метода, проводимого с помощью созданной тест-системы, осуществляли в разведениях 6-го международного стандарта НФГ с активностью гепарина 0,2 и 0,7 МЕ/мл, используя в качестве калибратора PCO НФГ. Показано, что точность тестирования разработанным методом, то есть близость результатов измерений с истинными значениями в обоих разведениях составляла 99 %. Измеренная этим методом активность НФГ в 6-м международном стандарте НФГ (2145 МЕ), разведенном в 1000 раз, была равна $(2,14 \pm 0,07)$ МЕ/мл. Систематическая погрешность, отражающая правильность тестирования, была равна 0,23, а коэффициент вариации, определяющий степень случайной погрешности, составлял 3,27 %.

Результаты измерений активности НФГ в международном стандарте с применением PCO НФГ в качестве калибратора позволили включить PCO НФГ в тест-систему.

Разработанный коагулологический метод, соответствующий требованиям Государственной фармакопеи [9], валидировали сравнением результатов измерений активности НФГ в полученном PCO клоттинговым тестом и рекомендуемым Государственной и Европейской фармакопеями [10] хромогенным методом определения анти-Ха активности гепарина при использовании междуна-

родного стандарта НФГ в качестве калибратора. По данным хромогенного метода активность НФГ в РСО была равна $(2,098 \pm 0,068)$ МЕ/мл с коэффициентом вариации 3,24 %. Сравнение полученных значений с указанными выше величинами активности НФГ в РСО, измеряемой коагулологическим тестом, свидетельствует о том, что применение методов, рекомендуемых и Государственной фармакопеей РФ, и Европейской фармакопеей, обеспечило сопоставимость результатов.

Так как качество результатов лабораторных измерений определяется правильностью и воспроизводимостью определений, то была проведена оценка внутрисерийной воспроизводимости, то есть сходимости измерений, отражающей близость получаемых результатов определений, выполненных в одной аналитической серии с помощью клоттингового метода. Воспроизводимость оценивали, измеряя активность гепарина в контрольных образцах, полученных разведением 6-го международного стандарта НФГ до значений 0,2 и 0,7 МЕ/мл, то есть в пределах нижней и верхней части нелинейного графика зависимости времени свертывания от активности гепарина (рисунок). Внутрисерийная воспроизводимость при низкой и высокой активности НФГ характеризовалась значениями стандартного отклонения 0,977 и 4,075 с и коэффициента вариации 2,61 и 3,42 %, соответственно. Межфлаконная вариация [16] разработанного РСО НФГ составляла 1,1 %. Нижний предел аналитической чувствительности метода с использованием разработанной тест-системы, определяемой как величина холостой пробы + 3 стандартных отклонения для серии из 20 измерений [15], была равна 0,144 МЕ/мл. Полученные данные по стабильности разработанного РСО НФГ в условиях ускоренного хранения свидетельствовали о возможности его использования в разработанном коагулологическом методе в течение 24 мес.

В результате проведенного исследования разработан клоттинговый метод и тест-система для измерений активности НФГ в его препаратах и субстанциях, соответствующие требованиям Государственной фармакопеей РФ 2015 г. издания. Разработанный метод характеризуется высокой правильностью и воспроизводимостью. По сравнению с используемым тестированием активности НФГ по времени рекальцификации предлагаемый метод не требует большого расхода реагентов и может быть автоматизирован. Результаты измерений активности НФГ, полученные разработанным и соответствующим требо-

ваниям отечественной Фармакопеей клоттинговым методом, были статистически значимо сопоставимы с таковыми рекомендуемого Европейской и Российской фармакопеей хромогенного метода. Таким образом, разработанное тестирование НФГ коагулологическим, также рекомендуемым Государственной фармакопеей РФ методом соответствует предъявляемым к аналитическому контролю требованиям и может быть применено для оценки эффективности этапов процесса производства и целевых лекарственных препаратов НФГ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Д. М. Зубаиров, *Молекулярные основы свертывания крови и тромбообразования*, ФЭН, Казань, ФЭН (2000), сс. 219 – 240.
2. Р. У. Колмен, *Нарушения реакций образования тромбина*, Медицина, Москва (1988), сс. 175 – 207.
3. M. Johnston, in: *Quality in Laboratory Hemostasis and Thrombosis*, S. Kitchen, J. D. Olson and F. E. Preston (eds.), Wiley-Blackwell (2009), pp. 170 – 178.
4. J. Choay, M. Petitou, J. C. Lormeau, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **116**, 492 – 499 (1983).
5. S. D. Niles, R. G. Sutton, J. Ploessl, et al., *J. Extracorpor. Technol.*, **7**, 197 – 200 (1995).
6. A. G. Turpie, A. S. Gallus, J. A. Hoek, *N. Engl. J. Med.*, **344**, 619 – 625 (2001).
7. European Pharmacopoeia 8.0. 2.7.5, *Assay of heparin*, 01 / 2008:20705 (2013), pp. 237 – 238.
8. In: *WHO Expert Committee on Specification for Pharmaceutical Preparations*, Thirty-second report, WHO, Geneva (1992), pp. 117 – 121.
9. Государственная Фармакопея РФ, XIII изд., *Количественное определение гепарина. Клоттинговый метод*, ОФС. 1.8.2.0003 (2015), сс. 921 – 922.
10. European Pharmacopoeia 8.3. 2.7.5, *Assay of heparin*, 01 / 2015:20705 (2015), p. 4187.
11. I. Gouin-Thibaut, I. Martin-Toutain, E. Peynaud-Debayle, et al., *Thromb. Res.*, **129**, 666 – 667 (2012).
12. A. M. van den Besselaar, A. Sturk, G. L. Reijniere, *Thromb. Res.*, **107**, 235 – 240 (2002).
13. S. Kitchen, I. Jennings, T. Woods, *J. Clin. Pathol.*, **49**, 10 – 14 (1996).
14. K. Cuker, A. Raby, K. A. Moffat, et al., *Thromb. Haemost.*, **104**, 837 – 844 (2010).
15. *Правила оценки аналитической чувствительности методов клинических лабораторных исследований*, ГОСТ Р 53022.2 – 2008, Стандартинформ, Москва (2009), с. 6.
16. В. И. Дворкин, В. Н. Малахов, Е. В. Заикин и др., *Аналит. химия*, **40**, 2117 – 2124 (1985).

Поступила 07.04.17

UNFRACTIONATED HEPARIN ACTIVITY TESTING IN PREPARATIONS AND SUBSTANCES

A. L. Berkovskii*, E. V. Sergeeva, and A. V. Suvorov

Federal Hematological Research Center, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 125167 Russia

* e-mail: aron56@mail.ru

Currently, development of effective technology of unfractionated heparin (UFH) preparations, which are widely used in clinical practice, is topical. The system for ensuring the quality of pharmaceutical preparations according to WHO guidelines requires, in particular, the use of specific and selective methods for monitoring the activity of heparin in preparations and substances. Based on the created test system, a clotting method was developed to measure the activity of UFH in its preparations and substances according to the coagulation method recommended by the State Pharmacopoeia of the Russian Federation. The method was evaluated according to the main analytical characteristics. Comparability of the results obtained using the proposed test with that based on determining the activity of UFH by the chromogenic method recommended by the existing Russian and European Pharmacopoeias is proved. The established accuracy, sensitivity and reproducibility allow us to recommend the validated coagulation method and proposed test system for introduction into the UFH manufacture process control.

Keywords: unfractionated heparin; coagulation methods; test systems; APTT reagents; production control.