

Рекомендована д-м біол. наук, проф. Л. С. Фірою
УДК 615.361.36+544:617-089.15/.16+656.562

РОЗРОБКА ТА ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДИКИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ НИЗЬКОМОЛЕКУЛЯРНИХ ГЕПАРИНІВ ДЛЯ МІЖОПЕРАЦІЙНОГО КОНТРОЛЮ

© М. І. Борщевська, В. Л. Шевіна, І. О. Омельченко

ВАТ "Фармак"

Резюме: розроблено експрес-методику кількісного визначення низькомолекулярного гепарину (еноксапарину натрію) у водному розчині, проведено її валідацію та досліджено кореляційну залежність між результатами кількісного визначення методами поляриметрії та біологічним.

Ключові слова: низькомолекулярний гепарин, еноксапарин натрію, поляриметрія, фактор анти-Ха, фактор анти-IIa.

Вступ. Гепарин та його похідні – біологічно активні речовини, антикоагулянти широкого спектра дії, регулятори багатьох біохімічних та фізіологічних процесів, які перебігають у організмі. Завдяки своїм властивостям гепарин та його похідні привертають увагу біологів, фізіологів, фармакологів та клініцистів [1, 2].

Препарати на основі гепарину використовують для лікування великої кількості захворювань: тромбози і тромбоемболії, ішемічна хвороба серця та інфаркт міокарда, гломерулонефрити та ін. [3, 4].

Промислове виробництво готових лікарських форм потребує належного контролю кількісного вмісту діючої речовини на всіх стадіях технологічного процесу. Кількісне визначення гепарину та низькомолекулярних гепаринів (згідно з ДФУ) основане на визначенні факторів згортання крові анти-Ха та анти-IIa [5]. Ці методики недоцільно використовувати як міжопераційний контроль виробництва готових лікарських засобів на основі низькомолекулярних гепаринів, тому що вони мають ряд суттєвих недоліків: 1) складна та тривала пробопідготовка (для кожної проби потрібно готувати нову серію розчинів порівняння); 2) перед кожним визначенням потрібно заново готувати розчини, необхідні для проведення експерименту; 3) тривалість методики 6-8 годин. Ми провели роботу із розробки експрес-методики для кількісного визначення низькомолекулярного гепарину. Гепарин за хімічною будовою являє високосульфований мукополісахарид, отже має здатність поляризувати світло [5], цю властивість ми узяли за основу при розробці методу.

Мета роботи: розробити експрес-методику кількісного визначення низькомолекулярного гепарину в водному розчині, провести її валідацію та дослідити кореляційну залежність між

результатами, отриманими методами поляриметрії та біологічним.

Методи дослідження. Предмет дослідження: субстанція низькомолекулярного гепарину виробництва Hangzhou Jiuyuan Gene Engineering Co., Ltd (с.200910809), Китай.

Об'єкт дослідження: водні розчини субстанції низькомолекулярного гепарину. Відповідні розчини низькомолекулярного гепарину готували ваговим методом в межах концентрацій від 90 МО/мг до 110 МО/мг.

Кут поляриметричного обертання вимірювали за допомогою приладу автоматичного поляриметра (Autopol III виробництва Rudolphresearch). Для біологічного методу контролю використовували прилади мікропланшетний імуоферментний аналізатор (Stat Fax 2100 виробництва Awareness Technology inc.) та мікропланшетний інкубатор/шейкер (Stat Fax 2200 виробництва Awareness Technology inc.) та такі реактиви: низькомолекулярний гепарин BRP CRS (с. № H0185000 с. 5), антитромбін III P1 виробництва "Sigma", фактор Ха бичачий, виробництва "Sigma", хромофорний субстрат P1 виробництва "Biophen", тромбін людський виробництва "Sigma", хромофорний субстрат P2 виробництва "Biophen".

Результати й обговорення. Відповідно до монографії ДФУ «Гепарини низькомолекулярні», кількісний вміст фактора анти-Ха визначається біологічним методом у діапазоні від 80 МО/мг до 125 МО/мг. Ваговим методом були приготовлені модельні розчини в діапазоні концентрацій від 90 МО/мг до 110 МО/мг. Шляхом визначення кута обертання модельних розчинів було побудовано калібрувальну криву, за якою визначали концентрацію низькомолекулярного гепарину в мг/г.

Методика поляриметрії: розчин А: наважку 11000 мг стандартного зразка низькомолекуляр-

ного гепарину (еноксапарину натрію) (EP CRS або USP) розчиняють в 10 мл води Р. За допомогою води Р кількісно переносять в колбу на 25 мл та доводять тим самим розчинником до мітки. Обережно перемішують, уникаючи утворення бульбашок.

Приготування розчинів порівняння: розчини порівняння готують послідовним розведенням розчину А у воді Р. Приготування виконують відповідно до таблиці 1.

Розчини доводять водою до мітки та перемішують, уникаючи утворення бульбашок.

Таблиця 1. Концентрації розчинів порівняння для побудови градуовального графіка

№ за/п	Об'єм аликвоти розчину А, мл	Об'єм колби для розведення	Концентрація розчину, мг/г
1	3	20	66
2	3,5	20	77
3	4	20	88
4	4,5	20	99
5	5	20	110

Для отриманих розчинів вимірюють кут оптичного обертання. За допомогою програми MicrosoftExcel будують графік залежності кута обертання α_i від концентрації C_i відповідних розчинів. За допомогою програми MicrosoftExcel розраховують рівняння прямої залежності концентрації від кута обертання (для лінійного типу калібрувальної прямої).

Точне значення концентрації отриманих розчинів порівняння розраховують за формулою:

$$C_i = \frac{m \times V_i}{25 \times 20} = \frac{V_i \times m}{500},$$

де C_i – концентрація отриманого розчину в мг/мл;

m – маса наважки еноксапарину натрію в мг;

V_i – об'єм аликвоти в мл.

Для випробуваного розчину вимірюють кут оптичного обертання і за допомогою калібрувальної прямої визначають концентрацію еноксапарину натрію в випробуваному розчині (мг/мл).

Вміст еноксапарину натрію має бути в межах від 95 до 105 мг/мл.

У результаті проведених досліджень із визначення концентрацій низькомолекулярного гепарину за допомогою поляриметричної методики та біологічним методом контролю отримано такі результати (табл. 2). Біологічним методом значення отримували в МО/мг, перерахунок в мг/г отримували діленням отриманої концентрації низькомолекулярного гепарину в розчині на заявлену активність субстанції.

Таблиця 2. Кількісний вміст фактора анти-Ха для водних розчинів низькомолекулярного гепарину

	Методика поляриметрії Активність фактора анти-Ха			Біологічний метод Активність фактора анти-Ха		
	90	100	110	90	100	110
Вміст розчину, мг/мл	75,110	81,716	91,900	75,25	83,61	91,97
МО/мг				9573	10495	11244

Для порівняння результатів двох методик був розрахований критерій Фішера згідно з ДФУ, який дорівнював 23,2. Отримане значення вище за табличне ($F(99\%; 8; 8) = 6,029$). Отже, при $P_1 = 99\%$ гіпотезу про розходження дисперсій s_1^2 і s_2^2 слід вважати статистично вірогідним.

Наступним кроком було проведення валідації запропонованої методики. Валідацію провели відповідно до монографій Державної фармако-

пеї України ("Валідація аналітичних методик і випробувань"). Проведено валідаційні випробування за тестами: специфічність, робастність, лінійність, точність, правильність, внутрішньолaboratorна точність.

Специфічність. Проводили вимірюванням значень поляризованого світла для розчину низькомолекулярного гепарину та для води. Отримані дані наведено в таблиці 3.

Таблиця 3. Порівняння кута обертання для розчину гепарину і розчинника

Середнє значення кута обертання розчину низькомолекулярного гепарину	2,431
Середнє значення кута обертання води (розчину порівняння)	0,004
Середнє значення кута обертання води (розчину порівняння), %	0,17
Вимоги, %	≤1,02

Розрахована невизначеність пробопідготовки $\Delta_{sv}=0,9534$.

Робастність. Для доведення робастності було проведено однакові досліди при температурах 15, 20 та 25 °С. Отримані результати наведені у таблиці 4.

Як видно з даних таблиці 4, результати, отримані при різних температурах, несуттєво відрізняються між собою. Також за рекомендацією ДФУ

Таблиця 4. Визначення еноксапарину натрію при різних температурах

Температура проби, °С	Введено/знайдено для низькомолекулярного гепарину, %	Різниця введено/знайдено для низькомолекулярного гепарину від 100%
15	97,45	2,55
20	97,74	2,26
25	97,71	2,29

комалекулярного гепарину 80, 100 та 120 % від номінальної. Розраховано концентрацію для кожного розчину ваговим методом, розраховано стандартне відхилення відносної концентрації. За результатами досліджень відносно стандартне відхилення становить 1,28 %.

Лінійність, точність, правильність. Метою даних випробувань було дослідження близькості результатів до прямої лінії. Було зроблено три незалежних розведення та побудовані графіки залежності кута обертання від концентрації. Середнє значення R^2 для трьох вимірювань становить 0,9997.

Вимоги до невизначеності результатів: 3,2%.

Рівноточність RSD_j за модифікованим критерієм Бартлетта: процентна точка m (таблична): 11,07, критерій Бартлетта-3,84. Дисперсії відрізняються незначно, вибірки рівноточні. $Student(95,1,11)=1,7956$. Вимоги до максимального допустимого RSD_p : 1,78, розраховане зна-

(2.2.N.2) було проведено дослідження стабільності кута обертання оптичної осі протягом двох годин для випробуваних розчинів гепарину та низькомолекулярного гепарину. Отримані результати показали, що розчини стабільні протягом досліджуваного часу.

Внутрішньолабораторна точність. У різні дні двома різними аналітиками проаналізовано дев'ять модельних розчинів з концентрацією низь-

чення RSD_p : 0,05, отже вимоги до збіжності вимірів витримуються. $Student(95, 1, 3) = 2,3534$, $S_{d,r}(\%)=0,26727691$, $Student(95, 1, 4) = 2,1318$.

Таким чином, отримані дані підтверджують, що вимоги до лінійності, точності та правильності вимірів витримуються.

Висновки. 1. У результаті проведених досліджень було запропоновано методику кількісного визначення гепарину та його похідних поляриметричним методом.

1. Методика відрізняється високою швидкістю виконання.

2. Проведено повний об'єм валідаційних досліджень, що підтверджують можливість застосування даної методики, $RSD = 0,700455$.

Підтверджена кореляційна залежність між результатами визначення кількісного вмісту низькомолекулярного гепарину поляриметричним та біологічним методами аналізу.

Література

1. Д.А. Маслаков Биологическая активность некоторых полисахаридов и их клиническое применение. – Минск, 1977 (615 М314).
2. А.И. Ульянов Современные данные о гепарине и его биохимических свойствах // Успехи современной биологии. – Т. 83.
3. Евтюхин А.И., Соколовская Н.Е., Леоненков В.В., Утешева М.А. Профилактика тромбоза глубоких вен и тромбоемболии легочной артерии у онкологических больных // Современная онкология. – 2001. – № 2.

4. Правосудова С.А., Истомин А.А., Белозерова Т.Ю. Профилактика тромботических осложнений после проведения транскатетерной разночастотной деструкции субстрата аритмии у пациентов с трепетанием предсердий и мерцательной аритмией: гепарин и эноксапарин (Клексан) // Український кардіологічний журнал. – 2001. – № 4. – С. 51-59.

5. ЕФ*, Monograph: Heparin Sodium, Enoxaparin Sodium Revision Bulletins.

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ГЕПАРИНОВ ДЛЯ МЕЖДУОПЕРАЦИОННОГО КОНТРОЛЯ

М. И. Борщевська, В. Л. Шевина, И. О. Омельченко

ОАО "Фармак"

Резюме: разработана экспрес-методика количественного определения низкомолекулярного гепарина (эноксапарина натрия) в водном растворе, проведена ее валидация и исследована корреляционная зависимость между результатами количественного определения методами поляриметрии и биологическими.

Ключевые слова: низкомолекулярный гепарин, эноксапарин натрия, поляриметрия, фактор анти-Ха, фактор анти-IIa.

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF METHODOLOGY OF QUANTATIVE DETERMINATION OF LOW-MOLECULAR HEPARINS FOR INTERSURGERY CONTROL

M. I. Borshchevska, V. L. Shevina, I. O. Omelchenko

OJSC "Pharmak"

Summary: it was developed the express-methology of quantative determination of low-molecular heparin (sodium enoxeparin) in aqueous solution; it was conducted its validation and was studied corellation dependance between results of quantative determination by polarimetric and biological methods.

Key words: low-molecular heparin, sodium enoxeparin, polarimetria, factor anty-Ha, factor anty-IIa.