

I. GAWĘCKA, R. WÓJCIK

OCENA METOD OZNACZANIA HEPARYNY W FARMAKOPEI BRYTYJSKIEJ I AMERYKAŃSKIEJ

Z Zakładu Farmakologii Instytutu Leków w Warszawie
Kierownik Zakładu: dr J. Venulet

Niezależnie od stosowanej metody, oznaczanie działania antykoagulacyjnego heparyny jest sprawą kłopotliwą ze względu na dużą liczbę czynników biorących udział w mechanizmie krzepnięcia krwi. Zależnie od materiału wyjściowego można wyodrębnić 8 różnych metod. W tej pracy zajmujemy się tylko dwoma metodami, którymi pracowano w naszym Zakładzie. Początkowo oznaczano heparynę wg metody podanej w farmakopei amerykańskiej XIV, której autorami są *Kuizenga, Nelson i Castland*. Od roku 1953 pracujemy w oparciu o opracowaną statystycznie metodę podaną przez *Adams'a i Smitha*, która jest zamieszczona w farmakopei brytyjskiej. Zajęliśmy się tym zagadnieniem, ponieważ wiele laboratoriów kontrolnych, stosując metodę pełnej krwi wykazało, że metoda USP XIV daje z reguły wyniki o 10% do 15% niższe od istotnej siły działania heparyny. Poza tym omówimy szczegółowo sposób przeliczania wyników uzyskanych według metody zamieszczonej w farmakopei brytyjskiej, z wprowadzeniem pewnych uproszczeń.

CZEŚĆ DOŚWIADCZALNA

W metodzie USP XIV używamy osocza owczego z dodatkiem cytrynianu sodu. W tym celu do 19 części świeżej krwi dodajemy jedną część 8% cytrynianu sodu i wirujemy przez 30 min. z szybkością 6000 obr./min. Następnie zbieramy osocze do butelek i zamrażamy w temp. — 20°C. Pobieranie krwi i zbieranie osocza wykonujemy jałowo. Zamrożone osocze możemy przechowywać przez szereg tygodni. Podstawowy roztwór wzorcowy heparyny przygotowujemy w sposób następujący: odważamy 25 mg międzynarodowego wzorca soli sodowej heparyny i rozpuszczamy w takiej ilości soli fizjologicznej, aby otrzymać 1 mg, tj. 130 jednostek w 1 ml.

Dla wykonania oznaczenia do 12 probówek o wymiarach 13 × 100 mm wlewamy roztwór wzorca w ilości 0,8 ml o stężeniu zmniejszającym się o 5% w każdej następnej probówce. W tym celu do osobnej probówki wlewamy 16 ml podstawowego roztworu wzorca, z których bierzemy po 0,8 ml i wlewamy kolejno do przygotowanych 12 probówek, dopełniając po każdym pobraniu zawartość probówki z roztworem wzorcowym solą fizjologiczną do objętości wyjściowej (16 ml)

$$\text{objętość wyjściowa} = \frac{110 \times 0,8 \text{ ml}}{\text{różnica kolejnych stęż.}} = \frac{80 \text{ ml}}{5} = 16 \text{ ml.}$$

Następnie rozlewamy po 1 ml osocza o ciepłocie pokojowej, a jako trzeci składnik dodajemy 0,2 ml 1% roztworu CaCl_2 . W ten sam sposób postępujemy z heparyną badaną przyjmując, że preparat jest zgodny z deklaracją. Po trzykrotnym wymieszaniu zawartości probówek, stawiamy oba szeregi do cieplarki o temp. 37°C na okres 1 godz. Wyniki reakcji oceniamy na podstawie 4 stopni skrzepu: 100%, 50%, 25% i 0. Porównujemy stopień skrzepnięcia probówek wzorcowych z heparyną badaną i do przeliczeń używamy te stężenia, w których otrzymaliśmy 50% skrzepu (po odwróceniu probówki do góry dnem nad korkiem zbiera się 1 ml płynu). Przeliczenia dokonujemy w sposób następujący:

Tabela I

Nr prob.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
J	0,8	0,76	.722	.686	.652	.619	.588	.559	.531	.504	.479	.455
Wz										50%		
Nr prob.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
H		50%										

$$\begin{aligned} & \frac{0,504}{0,76} = \frac{100}{x} \\ x &= 5040 : 76 = 66,3\% \end{aligned}$$

Według metody podanej w farmakopei brytyjskiej 1953 pracujemy na krwi wołowej zadanej 7% bezwodnym siarczanem sodu w stosunku objętościowym 1 : 5. Średnica probówek używanych do oznaczeń powinna wynosić dokładnie 13 mm. Przygotowujemy następujące stężenia wzorca i heparyny w wodzie destylowanej: 1,28 j./ml, 1,60 j./ml i 2,0 j./ml.

Do 6 probówek wlewamy po 1 ml wyżej wymienionych roztworów. Następnie dodajemy po 1 ml krwi, a potem roztwór tromboplastyny w takiej ilości, aby probówka wzorca zawierająca 2 j./ml krzepła w czasie 9—12 minut. Działanie takie wyzwała zazwyczaj 0,2 ml roztworu tromplastyny¹. Czas mierzymy stoperem od momentu dodania trzeciego składnika do powstania całkowitego skrzepu (probówkę można odwrócić do góry dnem). Procedurę tę powtarzamy czterokrotnie. Przykład zapisu czasu krzepnięcia krwi w minutach przedstawia tabela II.

Z otrzymanych czasów krzepnięcia można obliczyć potencję heparyny metodą analityczną, graficzną i uproszczoną przez zastosowanie nomogramu. Przez potencję rozumiemy określenie siły działania badanego preparatu w procentach w odniesieniu do wzorca.

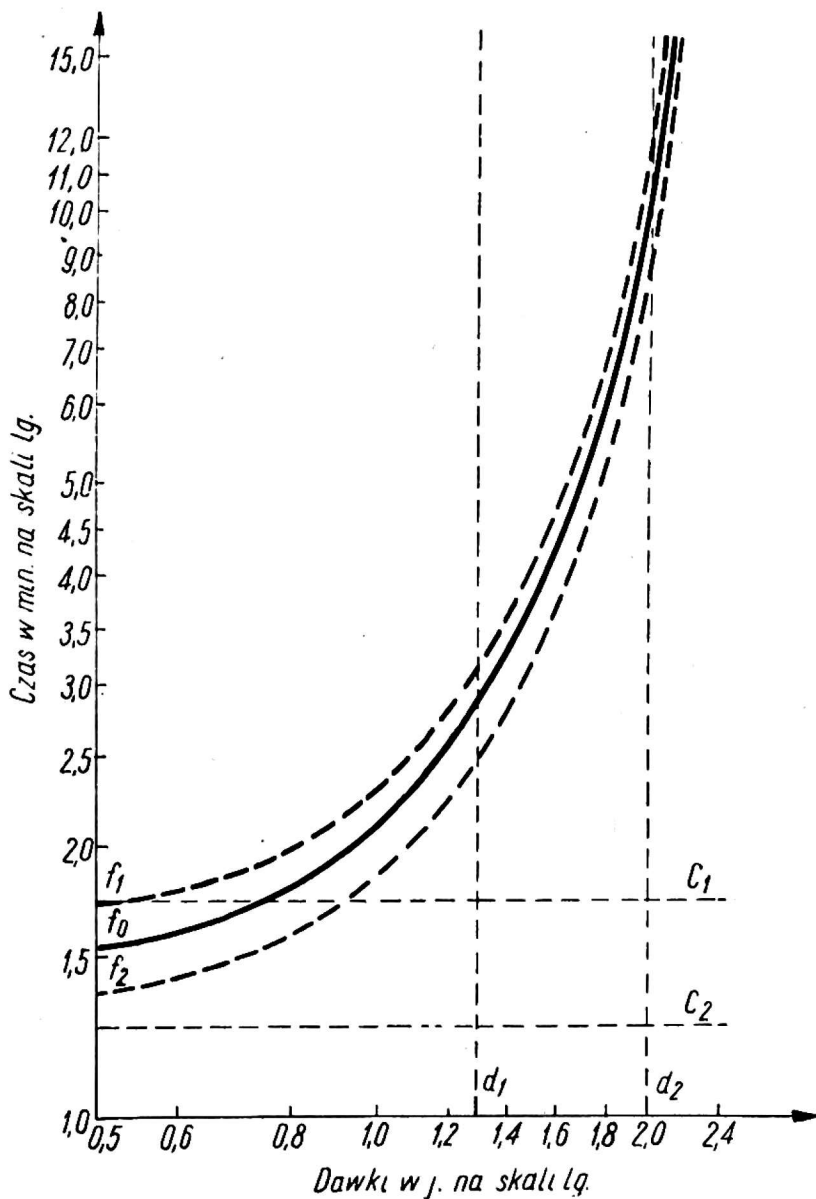
¹ Przygotowanie roztworu tromboplastyny: 1,5 g wysuszonego acetonem mózgu wołowego zalewamy 60 ml wody destylowanej i ogrzewamy przez 10—15 min. w temp. 50°C . Następnie wirujemy przez 2 min. z szybkością 1500 obr./min., płyn z nad osadu używamy do oznaczeń.

Tabela II

Powtórzenie	Wzorzec			Heparyna badana		
	1,28 j.	1,60 j.	2,0 j.	1,28 j.	1,60 j.	2,0 j.
1	$3\frac{3}{4}$	7	$9\frac{1}{4}$	$6\frac{3}{4}$	$8\frac{3}{4}$	$14\frac{1}{4}$
2	$3\frac{3}{4}$	$6\frac{1}{2}$	$9\frac{1}{2}$	$6\frac{3}{4}$	$8\frac{1}{2}$	15
3	$4\frac{3}{4}$	$6\frac{3}{4}$	$9\frac{1}{2}$	$6\frac{3}{4}$	8	$14\frac{1}{2}$
4	$4\frac{1}{2}$	$6\frac{1}{2}$	$9\frac{1}{4}$	$6\frac{3}{4}$	$8\frac{1}{4}$	$14\frac{3}{4}$

Zadaniem standaryzacji biologicznej jest oszacowanie potencji względnej wraz z granicami ufności, w których powinna znajdować się potencja rzeczywista. Wiarygodność szacunku musi być możliwie duża, nie mniejsza niż 0,95 tzn., że prawdopodobieństwo popełnienia błędu jest 5 razy na 100 oznaczeń.

Metodą, jaką posługuje się statystyka w tego rodzaju zagadnieniach jest analiza regresji tzn. porównanie linii regresji, jakie uzyskano dla



Ryc. 1. Kształt linii regresji reakcji krwi na dawkę heparyny. f_0 — kształt doświadczalnej linii regresji, f_1 , f_2 — krańcowe użyteczne linie regresji, c_1 , c_2 — doświadczalne poziomy krzepnięcia krwi nieheparynizowanej, d_1 , d_2 — użyteczny przedział dawek, w którym linie regresji mają w przybliżeniu postać prostolinią.

Fig. 1. The shape of the line of regression of the reaction of blood on the dose of heparin. f_0 — the shape of the experimental line of regression, f_1 , f_2 — extreme usable lines of regression, c_1 , c_2 — experimental lines of coagulation of non-heparinized blood, d_1 , d_2 — useful division of doses in which the lines of regression possess approximately straight line form.

wzorca i preparatu badanego (wyznaczają je czasy krzepnięcia w odniesieniu do odpowiednich dawek w układzie logarytmicznym). Dokładność ta-

kiej analizy w dużym stopniu zależy od kształtu linii regresji. Największą dokładność otrzymuje się wówczas, gdy linie regresji są proste, a użycie skali logarytmicznej znacznie ułatwia przeliczenia. Na podstawie szeregu doświadczeń stwierdziliśmy, że linia regresji reakcji na dawkę wzorca heparyny obliczona w układzie logarytmicznym ma postać funkcji potęgowej. Charakterystyczne jej parametry zależą od jakości krwi i wielkości dawki tromboplastyny.

Jeśli tak dobierzemy dawkę tromboplastyny, że czas krzepnięcia dla dawki wzorca o stężeniu 2,0 j./ml wynosi od 9 do 12 minut, to dla dawek od 1 j./ml do 2 j./ml przybliżenie regresji do linii prostej jest dla celów praktycznych w zupełności wystarczające.

Niemniej fakt, że krzywa reakcji ma postać paraboli i tylko w pewnym przedziale daje dobre przybliżenie do linii prostej powoduje obostrzenie planu standaryzacji. Przede wszystkim koniecznym jest dobranie odpowiedniego stężenia heparyny badanej, aby reakcja na nią nie „wypadła“ z przedziału liniowości. Z charakteru krzywej wynika, że im większa jest różnica między wzorcem a heparyną badaną, tym większy popełnia się błąd w oszacowaniu potencji.

Pomimo zawężenia przedziału dla dawek kontrolnych istnieje niebezpieczeństwo, że próbki w pewnych warunkach laboratoryjnych nie spełnią założenia liniowości regresji. Dlatego przy jakiegokolwiek zmianie warunków pracy należy dokonać dokładnej analizy statystycznej z zastosowaniem testu na liniowość i równoległość linii regresji przy pomocy analizy zmienności, której schemat jest podany w tabeli III.

Tabela III

L. p.	Źródło zmienności	Stopnie swobody	Sumy kwadratów	Wariancja
1	2	3	4	5
1	preparaty	1	$\frac{(U_1 + U_2 + U_3 - S_1 - S_2 - S_3)^2}{N} = \frac{T_a^2}{N}$	rubryka 4/3
2	regresja	1	$\frac{(U_3 + S_3 - U_1 - S_1)^2}{n \sum x_i^2} = \frac{T_b^2}{n \sum x_i^2}$	„
3	równoległość	1	$\frac{(U_3 + S_1 - U_1 - S_3)^2}{n \sum x_i^2}$	„
4	krzywe	1	$\frac{(U_1 + U_3 + S_1 + S_3 - 2U_2 - 2S_2)^2}{2N}$	„
5	różnice krzywych	1	$\frac{(2S_2 - 2U_2 + U_1 + U_3 - S_1 - S_3)^2}{2N}$	„
6	między dawkami	5	$\sum_{i=1}^k \frac{y_i^2}{n} - \frac{G^2}{N}$	„
7	wewnątrz dawek (resztowa)	18	$\sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^n y_{ij}^2 - \sum_{i=1}^k \frac{y_i^2}{n} = S^2$	„
8	ogólna	23	$\sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^n y_{ij}^2 - \frac{G^2}{N}$	

gdzie N — ogólna liczba obserwacji (24)

n — liczba powtórzeń (4)

k — liczba dawek (6)

U_r — suma obserwacji dla r -tej dawki heparyny

S_r — suma obserwacji dla r -tej dawki wzorca

G — suma wszystkich obserwacji

y_i — suma obserwacji dla i -tej dawki ogółem

y_{ij} — obserwacja dla i -tej dawki w j -tym powtórzeniu

x_i — dawki w przekształceniu ortogonalnym ($x_1 = 1$, $x_2 = 0$, $x_3 = 1$).

Porównując kolejno człony: „równoległość“, „krzywe“, „różnice krzywych“ z wariancją resztową sprawdzamy testem F-Snedecora ich istotność. Jeśli żaden z nich nie okaże się istotnym, to założenia o liniowości i równoległości linii regresji wzorca i heparyny badanej są słuszne. Jeśli natomiast któryś z nich będzie istotny, wyliczenia potencji względnej w niżej podany sposób dokonać nie można i trzeba próbę powtórzyć. Przy spełnionych założeniach i stałych warunkach laboratoryjnych można nie badać wzorca dla każdej próbki heparyny. Do wyliczeń wykorzystujemy wyniki doświadczenia na wzorcu uzyskane przy pierwszej próbie wykonanej tego dnia.

Celem przeprowadzenia analizy statystycznej wyniki doświadczenia przedstawiamy w skali logarytmicznej jak na tabeli IV.

Tabela IV

Powtórzenie	Wzorzec			Heparyna badana		
	log. 1,28 x_1	log. 1,60 x_2	log. 2,0 x_3	log. 1,28 x_4	log. 1,60 x_5	log. 2,0 x_6
1	0,57	0,84	0,97	0,83	0,94	1,15
2	0,57	0,81	0,98	0,83	0,92	1,18
3	0,67	0,83	0,98	0,83	0,90	1,16
4	0,65	0,81	0,97	0,83	0,92	1,17
Y_i	2,46	3,29	3,90	3,32	3,68	4,66
	S_1	S_2	S_3	U_1	U_2	U_3
R	0,10	0,03	0,01	0	0,04	0,03

Potencję względną można obliczyć ze wzoru

$$M = \frac{(U_1 + U_2 + U_3) - (S_1 + S_2 + S_3)}{b} \cdot v$$

gdzie v — stosunek dwóch kolejnych dawek w log.

$$b = \frac{(S_3 - S_1) + (U_3 - U_1)}{4(1^2 + 0^2 + (-1)^2 + 1^2 + 0^2 + -1^2)} = \frac{T_b}{4 \cdot 4} = \frac{T_a}{n \sum x_i^2}$$

Średni błąd potencji $V(M)$ znajdujemy ze wzoru

$$V(M) = \frac{s^2}{b^2} \left(\frac{v^2}{N_u} + \frac{v^2}{N_s} + \frac{M^2}{4 \cdot 4} \right)$$

Przy obliczaniu $V^2(M)$ należy sprawdzić, czy współczynnik regresji b istotnie różni się od 0.

Jeśli wartość graniczna współczynnika regresji

$$g = \frac{s^2 t^2}{b^2 n \sum x_i^2}$$

nie przekroczy 0,1, wartość $V^2(M)$ można obliczać według wyżej podanego wzoru.

Graniczną wartość potencji s_m (czyli granice przedziału ufności) obliczamy ze wzoru

$$s_m = tV(M)$$

t — wartość dewiatora z tablic rozkładu t -Studenta dla prawdopodobieństwa 0,95.

Tu dla przykładu dokonamy oszacowania potencji względnej omawianych wyników.

$$b = \frac{((3,90 - 2,46) + (4,66 - 3,32))^2}{16} = 0,174$$

$$g = \frac{0,0006 (2,1)^2}{0,030276 \cdot 16} = 0,005 < 0,1.$$

Zatem

$$M = \frac{(3,32 + 3,68 + 4,66) - (2,46 + 3,29 + 3,90)}{1,74} \cdot 0,097 = 0,0940$$

$$P = N \log \cdot 2,0940 = 124,1\%$$

oraz

$$V^2(M) = \frac{0,0006}{0,030276} \left(\frac{0,097^2}{12} + \frac{0,097^2}{12} + \frac{0,094^2}{16} \right) = 0,000042$$

$$V(M) = \sqrt{0,000042} = 0,0065$$

$$s_m = 2,1 \cdot 0,0065 = 0,0138$$

stąd

$$M_1 = 0,094 - 0,0138 = 0,0802$$

$$M_2 = 0,094 + 0,0138 = 0,1078$$

czyli

$$P_1 = N \log \cdot 2,0862 = 121,3\%$$

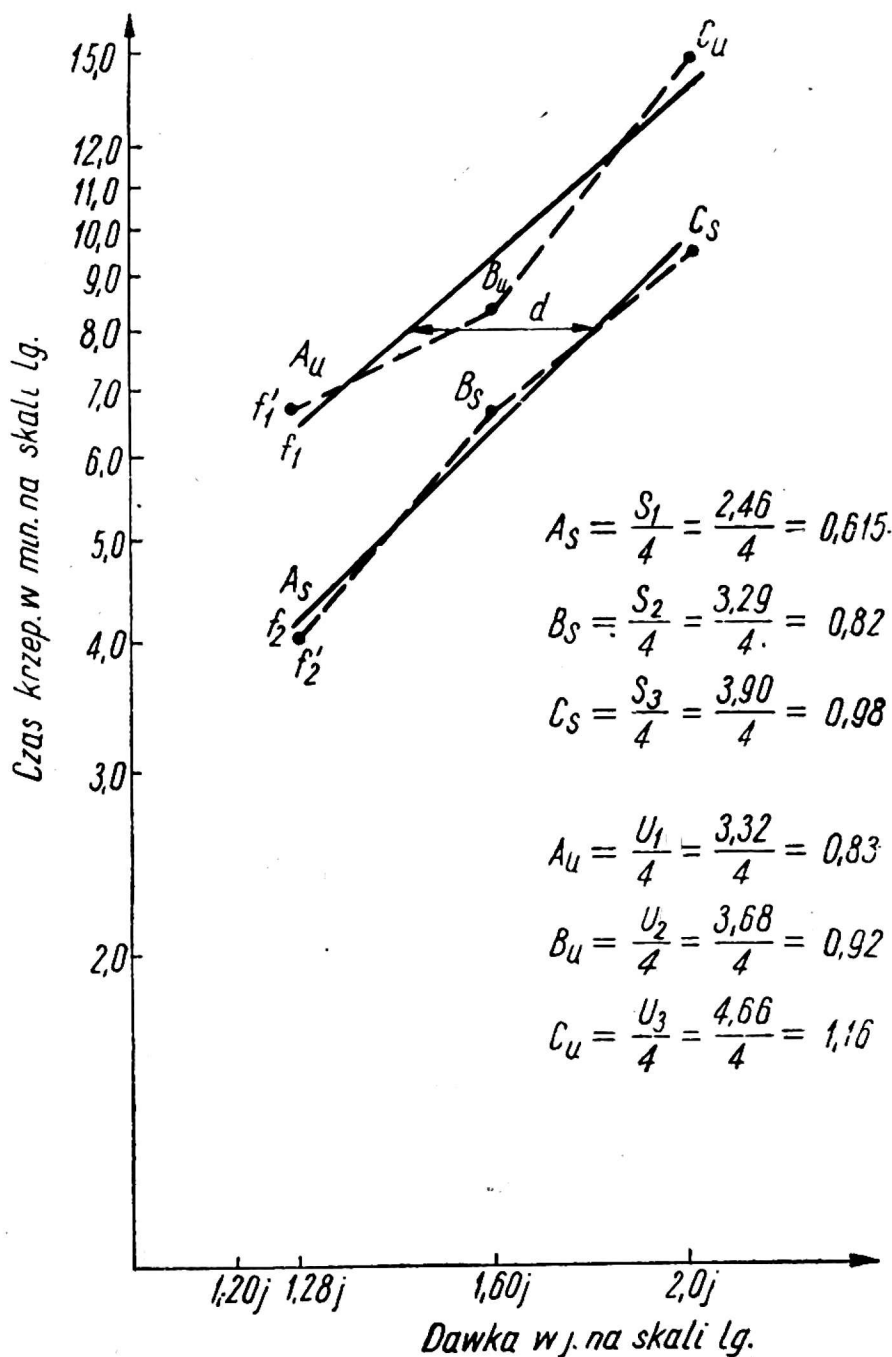
$$P_2 = N \log \cdot 2,1078 = 128,2\%$$

Oszacowanie potencji względnej można również dokonać graficznie. Metoda graficzna jest mniej dokładna, ponieważ przez otrzymane doświadczalnie 3 punkty tak dla wzorca jak i dla heparyny badanej przeprowadzamy linie proste z pewną dowolnością. Nie mamy oczywiście wtedy możliwości sprawdzenia istotności odchylenia od liniowości i równoległości.

Wyznaczenie błędu doświadczenia jest wówczas także nieosiągalne. Metodę graficzną stosować można tylko przy dużej wprawie.

Ze względu na zawilóść podanej metody analitycznej, a niedokładność graficznej najbardziej celowe jest korzystanie z nomogramu (ryc. 3).

W celu obliczenia potencji przy użyciu nomogramu wyznaczamy wartość liczbową dla T_a (jest to suma logarytmów reakcji preparatu badanego mniej suma logarytmów reakcji wzorca) i T_b (suma różnic logarytmów reakcji przy dawkach najwyższych i najniższych wzorca i heparyny



Ryc. 2. f'_1, f'_2 — linie regresji uzyskane w doświadczeniu, f_1, f_2 — teoretyczne linie regresji, d — lg. potencji wyrażony w cm $\frac{1,9 \text{ cm}}{20 \text{ cm}} =$

$= 0,095 = M$, jednostka skali x wynosi 20 cm.

Fig. 2. f_1, f_2 — the lines of regression obtained in the experiment, f_1, f_2 — theoretical lines of regression, d — lg. potential expressed in cm

$= \frac{1,9 \text{ cm}}{20 \text{ cm}} =$
 $= 0,095 = M$, the unit of the scale x amounts to 20 cm.

badanej). Następnie odkładając te dwie wielkości na odpowiednich skalach łączymy je linią prostą. Z przecięcia się tej linii z linią skośną nomogramu odczytujemy potencję wyrażoną w procentach.

$$T_a = (3,32 + 3,68 + 4,66) - (2,46 + 3,29 + 3,90) = 2,01$$

$$T_b = (3,90 - 2,46) + (4,66 - 3,32) = 2,72$$

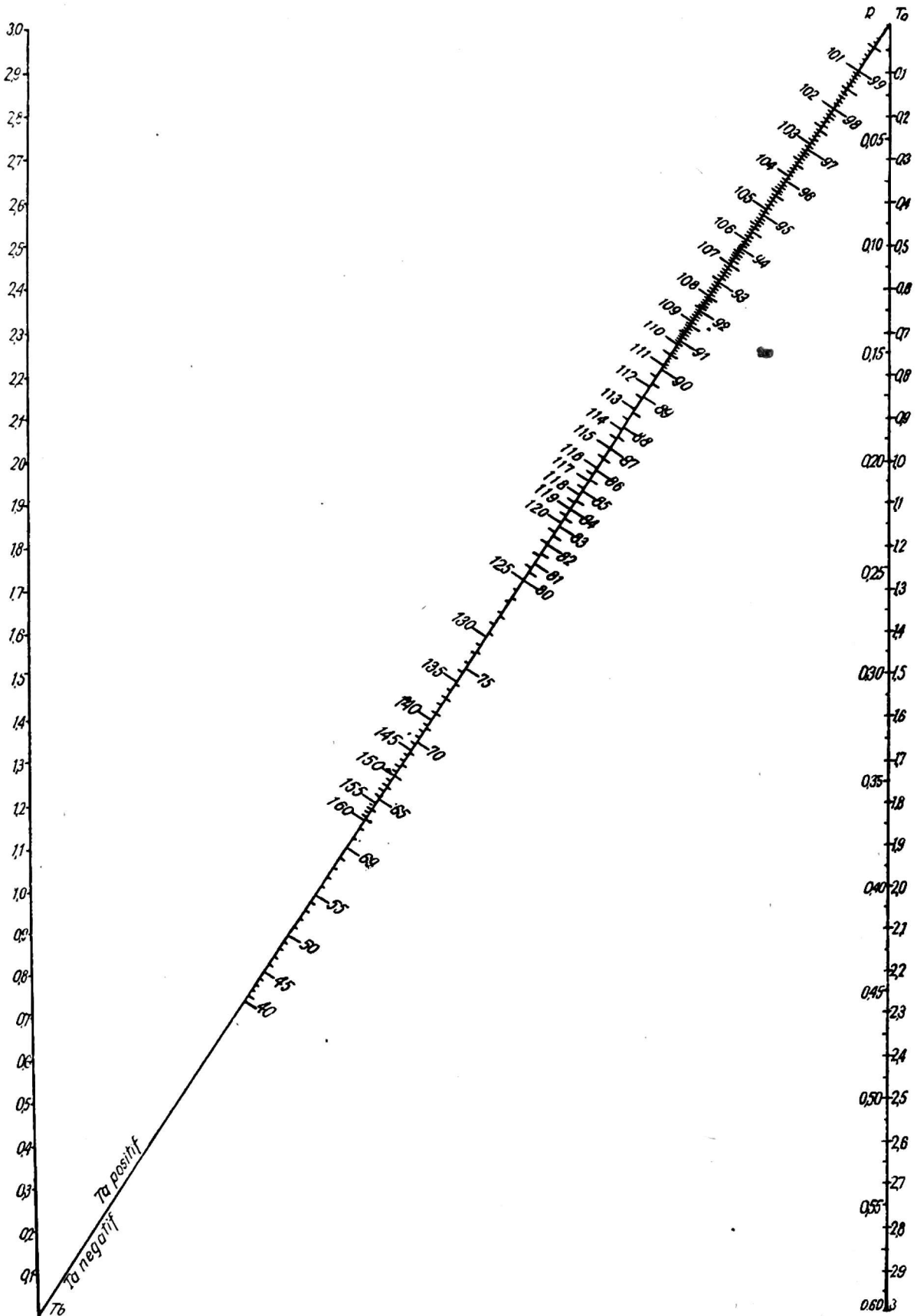
$$R = \frac{0,10 + 0,03 + 0,01 + 0 + 0,04 + 0,03}{6} = 0,035$$

Z odłożenia T_a i R na odpowiednich skalach, na linii skośnej odczytujemy granice ufności potencji.

Odczytana z nomogramu potencja wynosi:

$$P = 124,5\%$$

z granicami ufności $P_1 = 122\%$ i $P_2 = 127\%$.



Ryc. 3. Nomogram dla standaryzacji heparyny met. Adams'a w doświadczeniu 2×3 (128 j., 1,6 j., 2,0 j.).

Fig. 3. Nomogram for the standardization of heparin by means of Adams's method in the experiment 2×3 (128 u., 1,6 u., 2,0 u.).

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Porównując ze sobą obie metody trzeba stwierdzić, że zaletą metody podanej w USP XIV jest możliwość przechowywania osocza przez kilka tygodni oraz łatwość przeliczeń. Ujemną jej stroną jest subiektywna ocena stopnia skrzepnięcia, oraz fakt, że uzyskuje się nią tylko około 80% wartości rzeczywistej siły działania heparyny (*Jorpes*). Podobne wyniki dały i nasze doświadczenia (tabela V).

Tabela V

Nr serii heparyny	Wyniki otrzymane metodami	
	USP XIV w %	P. B. 1953 w %
142	60	69
151	54	99
157	63	69
159	59	68
160	62	77
162	48	77
163	62	67
167	56	68
172	55	67
173	64	72
174	63	65
175	58	79

Przyczyną tego zjawiska jest niezbyt szczęśliwie dobrany układ doświadczalny i moment rekalkyfikacji, który może być źródłem dużych błędów. Rekalkyfikowane osocze jest sztucznym układem krzepnięcia, w którym trombocyty ulegają uszkodzeniu. Według *Mangieri* roztwór CaCl_2 powinien być mierzony z dokładnością 5%, toteż w danym wypadku przy podawaniu 0,2 ml uniknięcie nadmiaru jonów wapnia jest trudne. Ponadto pełna krew jest bardziej stabilna niż jej osocze szczawianowane czy cytrynianowane.

Dodatkowe zalety metody *Adams'a* i *Smitha* wypływają z własności samej heparyny. Duża cząsteczka polisacharydowa wpływa przez ładunek elektryczny na fizykochemiczny stan strącania białek w procesie krzepnięcia. W pierwszej — działa jako antyprotrombina przez zobojętnienie tromboplastyny. W drugiej fazie powoduje ona wzrost antytrombiny osoczowej. Toteż metody tromboplastynowe i trombinowe są lepsze z punktu widzenia kinetyki krzepnięcia, ponadto w tych metodach rekalkyfikacja jest zbędna.

W metodzie *Adams'a* i *Smitha* w przeciwieństwie do metody USP XIV za reakcję przyjmujemy czas całkowitego skrzepnięcia, który przez dodanie tromboplastyny staje się ostrzejszy i stosunkowo łatwo daje się określić z żądaną dokładnością. Duża zawartość co-faktora w krwi wołowej jest ważna dla dokładnej standaryzacji heparyny.

Porównując ze sobą obie wypróbowane przez nas metody na podstawie uzyskanych wyników skłaniamy się ku metodzie podanej w farmakopei brytyjskiej (*Adams* i *Smith*). Metoda USP XIV uległa z kolei pewnej mo-

dyfikacji i następne wydanie farmakopei amerykańskiej (USP XV) wprowadziło statystyczną interpretację wyników, co podniesie niewątpliwie dokładność oceny wyników nie zmieniając oczywiście ich bezwzględnej wartości.

И. Гавенцка, Р. Вуйцик

ОЦЕНКА МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕПАРИНА ПО БРИТИЙСКОЙ И АМЕРИКАНСКОЙ ФАРМАКОПЕИ

Содержание

Описано два метода определения биологической валентности гепарина, а именно опубликованный в Американской фармакопее XIV и обязывающий в Англии от сентября 1953 года.

На базе результатов полученных в фармакологическом отделении лекарственного Института (Zakład Farmakologii Instytut Leków) установлено, что американский метод дает более низкие величины, что подтверждается библиографическими сведениями.

Подробно описан статистический пересчет английского метода и графического способа. В связи с кропотливостью первого и неточностью — второго применением номограмма предложены некоторые упрощения пересчета.

I. Gawęcka, R. Wójcik

EVALUATION OF METHODS OF ESTIMATION OF HEPATIN IN BRITISH AND AMERICAN PHARMACOPEA

Summary

The procedures of two methods of estimating the biologic value of heparin have been discussed, viz., the one given in the American Pharmacopea XIV and the one obligatory in England since Sept. 1953.

Basing on the results obtained in the Department of Pharmacology of the Institute of Drugs in Warsaw it was ascertained that the American method yields as a rule lower values which is confirmed by the data in the literature.

Statistical computations employed in the English method with consideration of analysis and graphic procedure are presented in a detailed manner. Due to toilsome procedure of the former method and inaccuracy of the latter certain modifications for computation have been proposed by employing a nomogram.

PIŚMIENNICTWO

1. Adams S. et Smith K.: J. Pharm. et Pharmacol., 1950, 2, 836. — 2. Birger H. et Blambäch M., Cornelinsson E. et Jorpes J. E.: J. Pharm. et Pharmacol., 1953, 5, 1031. — 3. Jalling O., Jorpes J. E., Linden G.: J. Pharm. et Pharmacol., 1946, 19, 96. — 4. Jorpes J. E.: Acta pharmacol. et toxicol., 1955, 11, 367. — 5. Kuzenga M., Nelson J. i współpr.: Am. J. Physiol., 1943, 158, 612. — 6. Mangieri C.: J. Lab. Clin. Med., 1947, 32, 901. — 7. Studer A. et Winterstein A.: Helv. Physiol. Pharmacol. Acta, 1951, 9, 6. — 8. Philippe: Annales Pharmaceut Franc., 1957, 15, 55.

Otrzymano dnia 28. III. 1958 r.