

低分子肝素活性测定中生物统计的应用

王文杰, 韩冬云, 张秀梅

(吉林华康药业股份有限公司, 敦化 133700)

摘要 目的: 对低分子肝素 (LMWH) 生物活性 (抗 - FX a 和抗 - FII a) 测定中几种生物统计方法进行探讨。方法: LMWH 生物活性测定采用发色底物分光光度法, 运用量反应平行线原理生物统计, 比较几种实验设计、统计方法, 检测实验可靠性、计算效价、精密度的差异。结果: 发色底物分光光度法的量反应平行线法几种实验设计、统计方法结果相似, 其差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论: 对 LMWH 的抗 - FX a 和抗 - FII a 效价测定采用发色底物分光光度法; 以量反应平行线法进行分析。在符合标准规定前提下, 几种生物统计方法和实验设计都可应用。

关键词: 低分子肝素; 效价测定; 生物统计

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2009)02-0272-03

Evaluation the potency of low- molecular- weight heparin by bio- statistical methods

WANG Wen- jie, HAN Dong- mei, ZHANG Xiu- mei

Jilin Huakang Pharmaceutical Co., Ltd., Dunhua 133700, China)

Abstract **Objective** Discussion of bio- statistical methods for anti- factor Xa or anti- factor IIa of low- molecular- weight heparin (LMWH) evaluation. **Method** Chromogenic assay was used for bio- activity of LMWH by quantity response parallel line analysis. Different bio- statistical methods and design were compared for experimental reliability examination, potency and precise in analysis results. **Results** The differences of several bio- statistical methods and design by parallel line analysis were small and not statistically significant ($P > 0.05$). **Conclusion** Several bio- statistical methods and design could be used in validation of the anti- factor Xa or anti- factor IIa chromogenic assays for the potency assessment of LMWH by parallel line analysis, when the results conforms to the standard.

Key words low- molecular- weight heparin (LMWH); potency assay; bio- statistics

低分子肝素 (low- molecular- weight heparin, LMWH) 有抗凝血、抗血栓、调血脂、抗肿瘤等作用, 与普通肝素相比具有皮下注射吸收好、半衰期长、生物利用率高、与血浆及血小板亲和力小、出血副作用少等优点, 应用日益广泛^[1,2], 对 LMWH 质量控制中生物活性即抗活化 10 因子 (抗 - FX a) 和抗活化 2 因子 (抗 - FII a) 测定, 采用体外酶促反应的分光光度法, 由于低分子肝素不是化学纯品, 是一定分子量范围内的多相性成分的分布, 其不均一性对显色反应的分光光度法有一定误差, 不够精确, 因此, 正确地运用生物统计显得尤为重要, 笔者对 LMWH 效价测定中遇到的生物统计问题进行探讨。

1 仪器与试剂

日立 U-3310 紫外分光光度计 (日本)。标准品 (S): LMWH 欧州药典参考品, 抗 - FII a $44.2 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和抗 - FX a $106.1 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。供试品 (T): LMWH 钠注射液, 吉林华康药业股份有限公司 (抗 - FX a $5000 \text{ IU} \cdot 0.5 \text{ mL}^{-1} \cdot \text{支}^{-1}$), 批号 070101。抗凝血酶 (AT) $10 \text{ IU} \cdot \text{瓶}^{-1}$ 、FX a $71 \text{ nkat} \cdot \text{瓶}^{-1}$ 、发色底物 S-2765 $25 \text{ mg} \cdot \text{瓶}^{-1}$ 、S-2238 $25 \text{ mg} \cdot \text{瓶}^{-1}$ 均为 Chromogenic 公司提供; 凝血酶国家标准品 ($580 \text{ IU} \cdot \text{瓶}^{-1}$), 中国药品生物制品检定所。计算程序采用中国药品生物制品检定所编制的中国药典生物检定统计程序 BS2000。

2 实验方法

目前英国药典 (BP)^[3] 与拟用国家标准^[4] 中 LMWH 的抗 - FX a 与抗 - FII a 测定为发色底物分光光度法, 其原理为 LMWH 与 ATII 形成复合物, 小于 18 个糖链的 LMWH 与 ATII 的复合物抑制 FX a 与发色底物 S- 2765 的水解反应; 而大于 18 个糖链的 LMWH 与 ATII 的复合物, 同时结合凝血酶即 FII a 而抑制 FII a 与发色底物 S- 2238 产生水解反应; 水解反应都生成显色的对硝基苯胺, LMWH 与对硝基苯胺成反比。

2.1 运用生物统计量反应平行线 4• 4 测定法 (4• 4 法) 应用量反应平行线的等反应剂量对比 4• 4 法, 即标准品 ($S_1 \sim S_4$) 与供试品 ($T_1 \sim T_4$) 各用 4 个剂量组, 每一剂量组重复 2 次, 溶液试管排列顺序: $S_1 S_2 S_3 S_4 T_1 T_2 T_3 T_4 T_1 T_2 T_3 T_4 S_1 S_2 S_3 S_4$, 以减小实验误差中的加样次序因子, 控制变异。抗 - FX a (抗 - FII a) 测定依次每管加入抗凝血酶、FX a (FII a 即凝血酶)、发色底物 S- 2765 (S- 2238), 每加一试剂 37 °C 保温一定时间, 酶促反应后, 冰醋酸终止反应^[4], 405 nm 波长处测其吸收度作为反应值, 反应值与 log 剂量间按量反应平行线 4• 4 测定法, 一般随机设计, 生物统计计算效价 (PT) 和实验误差 (平均可信限率 FL%)^[5 6]; 而不能用标准曲线法, 因其结果不可靠, 误差大, 难以判定结果^[4], 运用生物统计尤为重要。

2.2 生物统计量反应平行线 4• 3 (3• 4) 法或 3• 3 法 实验设计虽按 4• 4 法, 但当 S 或 T 的端剂量所致反应值偏离直线, 未达阈值或趋于极限, 去除此端剂量组 (最大或最小剂量), 采用量反应平行线 4• 3 (3• 4) 法或 3• 3 法的生物统计算法, 即标准品 (S) 与供试品 (T) 3 或 4 个剂量组, 使对数剂量与反应的直线关系成立。

2.3 合并计算 同一批供试品重复测定 n 次, 对所得 n 个测定结果采用生物统计合并计算的方法求其平均效价 PT 和平均可信限率 FL%,

3 结果

3.1 应用 4• 4 法 抗 - FX a 与抗 - FII a 效价测定 中, BP^[1] 与拟用国家标准^[2] 都规定用量反应平行线 4• 4 测定法, 实验可靠性必须测验通过, 也就是对数剂量与反应呈直线关系, 标准品 S 和供试品 T 的直线应平行, 方差分析试品间、回归、偏离平行、二次曲线和反向二次曲线等几项; 要求直线回归 $P < 0.01$, 偏离平行、二次曲线和反向二次曲线都必须 $P > 0.05$ 实验才成立, 以确保结果可靠。拟用国家标准^[2] 还规定 FL% 在 15% 以内。笔者对同一批号 LMWH 抗 - FX a 效价测定中运用量反应平行线 4• 4 法进行 10 次实验, 生物统计计算结果, 实验可靠性测验通过, 并且 FL% 都在 15% 以内, 符合标准规定。见表 1。

表 1 几种实验设计、生物统计计算结果
Tab 1 The results of several bio- statistical methods and design

n	方法 (method) 4• 4		方法 (method) 4• 3		方法 (method) 3• 4		方法 (method) 3• 3	
	效价 (PT) / U • 0.5 mL ⁻¹ • 支 ⁻¹	平均可信限 率 (FL) %	效价 (PT) / U • 0.5 mL ⁻¹ • 支 ⁻¹	平均可信限 率 (FL) %	效价 (PT) / U • 0.5 mL ⁻¹ • 支 ⁻¹	平均可信限 率 (FL) %	效价 (PT) / U • 0.5 mL ⁻¹ • 支 ⁻¹	平均可信限 率 (FL) %
1	5307	12	5399	14	5340	14	5345	15
2	5191	4	5114	4	5123	4	5160	5
3	5131	5	5131	5	5138	5	5154	6
4	4918	7	4923	8	4916	8	4914	9
5	4949	8	4947	8	4945	8	4943	9
6	5062	9	5081	10	5090	10	5100	12
7	5106	9	5136	11	5129	11	5127	13
8	5023	6	5048	7	5050	7	5057	8
9	5134	8	5067	10	5112	10	5145	12
10	5034	8	5007	10	5018	10	5034	12
$\bar{x} \pm SD$	5085 ± 115	8 ± 2	5085 ± 132	9 ± 3	5086 ± 118	9 ± 3	5098 ± 122	10 ± 3

3.2 应用 4• 3 法、3• 4 法和 3• 3 法

对上述同一批号 LMWH 抗 - FX a 效价测定数据, 去除一个端剂量组时, 采用 4• 3 法、3• 4 法和 3• 3 法统计计算, 其结果也都能符合标准规定, 几种统计方法结果相似, 它们的效价 PT 与 4• 4 法得出

的效价 PT 比偏差较小 (见表 1), 在生物统计误差允许范围内, 其差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 因此采用 4• 3 法、3• 4 法和 3• 3 生物统计算法是可行的, 但 10 次实验 4• 3 法的平均 PT 值与 4• 4 法最为接近, 其次为 3• 4 法和 3• 3 法, 由此可见应尽可

能多的利用数据, 3• 3法是最后选择。

这一统计方式尤其可运用于当 4• 4法实验可靠性测验不通过, 偏离平行或二次曲线或反向二次曲线 ($P < 0. 05$), 是端剂量所致反应值偏离直线, 可删除端剂量即最高或最低的一个剂量组 (不可删除

中间剂量组), 采用 4• 3法 (3• 4法), 如仍然不通过, 可采用 3• 3生物统计计算法, 使实验可靠性测验通过 (表 2), 使结果符合标准规定, 尽可能利用数据, 从而节约人力、物力, 节约时间, 提高实验成功率, 正确判断药品的质量。

表 2 使实验可靠性测验通过的生物统计、实验设计方法
Tab 2 Using bio- statistical methods and design for the experimental reliability examination passes

n	方法 (method) 4• 4			方法 (method) 4• 3			方法 (method) 3• 3		
	效价 (PT)	平均可信	实验可靠性测验	效价 (PT)	平均可信	实验可靠性测验	效价 (PT)	平均可信	实验可靠性测验
	/U•	限率 (FL)	(experimental	/U•	限率 (FL)	(experimental	/U•	限率 (FL)	(experim ental
	0. 5 mL ⁻¹	%	reliability	0. 5 mL ⁻¹	%	reliability	0. 5 mL ⁻¹	%	reliability
	• 支 ⁻¹		examination)	• 支 ⁻¹		examination)	• 支 ⁻¹		examination)
1	5187	4	不可靠 (unreliable)	5101	5	可靠 (reliable)	5160	5	可靠 (reliable)
2	5162	4	不可靠 (unreliable)	5144	5	不可靠 (unreliable)	5140	6	可靠 (reliable)
3	5238	10	不可靠 (unreliable)	5202	10	可靠 (reliable)	5241	12	可靠 (reliable)
4	4987	7	不可靠 (unreliable)	4969	8	可靠 (reliable)	4971	9	可靠 (reliable)
5	5120	8	不可靠 (unreliable)	5109	8	可靠 (reliable)	5146	9	可靠 (reliable)
6	5022	10	不可靠 (unreliable)	5045	10	可靠 (reliable)	5050	11	可靠 (reliable)
7	5325	10	不可靠 (unreliable)	5339	10	不可靠 (unreliable)	5310	11	可靠 (reliable)
8	5007	6	不可靠 (unreliable)	4989	7	可靠 (reliable)	5001	9	可靠 (reliable)
9	5198	9	不可靠 (unreliable)	5121	10	不通过 no passed	5188	12	可靠 (reliable)
10	5012	9	不可靠 (unreliable)	5008	10	可靠 (reliable)	5031	11	可靠 (reliable)

3. 3 应用合并计算 在常规检定中为达到增加实验精密度、降低可信限率的目的, 可将检定结果合并计算^[6]。如测定 LMWH 抗 - FX a效价, 实验可靠性测验通过, 但 FL为 18. 6%, 超出标准规定 15%, 重复测定 1次, 实验可靠性测验通过, FL为 16. 7%, 仍未符合标准规定, 可将 2次结果合并计算 (表 3), 而使 FL降低, FL仅为 11. 4%, 符合对可信限率小于 15%的要求, 符合标准规定, 从而最大限度地利用实验数据, 增加实验精密度, 降低可信限率。

表 3 结果合并计算

Tab 3 The results of merge computation

n	效价 (PT) /U•	标准误差	平均可信限率
	0. 5 mL ⁻¹ • 支 ⁻¹	(an)	(FL) %
1	5132	0. 034737	18. 6
2	5068	0. 031236	16. 7
合并计算 (merge computation)	5096	0. 023227	11. 4

4 讨论

由于 LMWH 不是化学纯品, 是一定分子量范围内的混合物, 它的不均一性对显色反应的分光光度法有一定误差, 因此不能用一般的标准曲线法计算效价, 要用生物统计, 标准规定实验可靠性测验必须通过和 FL不大于 15%。一般采用量反应平行线原

理的 4• 4法, 进行实验可靠性测验, 使结果可靠。当实验可靠性测验不通过时, 是端剂量所致反应值偏离真直线, 去掉端剂量组, 可采用 4• 3法或 3• 4法, 或 3• 3法生物统计, 最终使实验可靠性测验通过, 节约成本, 提高实验成功率。当 FL超出 15%时, 可将 2次或更多次结果合并计算, 增加实验精密度, 降低 FL, 以符合标准规定。

参考文献

1 Hish J Raschke R. Heparin and low-molecular-weight heparin the seventh ACCP conference on antithrombotic and thrombolytic therapy Chest, 2004, 126(3 Suppl): 188
2 Mousa SA, Mohamed S. Anti-angiogenic mechanisms and efficacy of the low molecular weight heparin, tinzaparin anti-cancer efficacy OncolRes 2004, 12(4): 683
3 BP. 2003. 741
4 LI Zhan-jun(李湛军). Comparison of methods for evaluation the potency of low-molecular-weight heparin (低分子肝素生物活性测定的方法比较研究). Chin J Pharm Anal (药物分析杂志), 2005, 25(9): 1111
5 ChP(中国药典). 2005. VolII (二部): Appendix(附录) X IV
6 ZHOU Hai-jun(周海钧), SHEN Yun-nu(申蕴如). Statistic method for bioassay(生物检定统计方法). Beijing(北京): People Medical Publishing House(人民卫生出版社), 1988. 139, 209
(本文于 2008年 12月 3日修改回)