

УДК 615.373:615.065

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-1-49-59>

Научная статья | Scientific article



Стандартизация метода определения содержания активатора прекалликреина в лекарственных препаратах иммуноглобулинов и альбумина человека

О.Г. Корнилова , М.А. Кривых, А.А. Воропаев, О.В. Фадейкина, Р.А. Волкова

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

✉ Корнилова Ольга Геннадьевна; Kornilova@expmed.ru

Резюме

Оценка содержания активатора прекалликреина является необходимой составляющей контроля специфической безопасности лекарственных препаратов иммуноглобулинов и альбумина человека. Вариабельность свойств биологических реагентов прекалликреина человека, хромогенного субстрата указывает на необходимость стандартизации хромогенного метода использованием компонентов стандартного образца (СО) не только для построения калибровочного графика, но и для подтверждения достоверности, стабильности и воспроизводимости полученных результатов в различных диапазонах значений в пределах регламентированных. **Цель работы:** совершенствование процедуры контроля качества препаратов из плазмы крови человека по содержанию активатора прекалликреина. **Материалы и методы:** содержание активатора прекалликреина определяли хромогенным методом по общей фармакопейной статье 1.8.2.0013.18 Государственной фармакопеи Российской Федерации с использованием реагентов прекалликреина различных производителей. СО разрабатывали на основе метода добавок с использованием раствора альбумина человека и реагента β -фрагмента фактора Хагемана. По результатам определения содержания активатора прекалликреина в компоненте контроля строили контрольные карты Шухарта. **Результаты:** методом добавок разработан двухкомпонентный СО содержания активатора прекалликреина с регламентированным количеством β -фрагмента фактора Хагемана; обоснована необходимость комплектации СО реагентом прекалликреина отечественного производства; отраслевой стандартный образец (ОСО) 42-28-445 аттестован с использованием всех доступных реагентов прекалликреина человека, ОСО 42-28-446 – с использованием реагента прекалликреина, входящего в состав набора. Аттестованное значение содержания активатора прекалликреина составило: в компоненте для оценки содержания активатора прекалликреина серии 1 обоих ОСО – 51 МЕ; в компоненте контроля ОСО 42-28-445 при восстановлении в 1,0 мл воды очищенной – 8,3–11,9 МЕ/мл, при восстановлении в 2,0 мл воды очищенной – 5,4–6,6 МЕ/мл; в компоненте контроля ОСО 42-28-446 – 9,1–11,1 и 5,6–6,4 МЕ/мл соответственно. Компонент для оценки содержания активатора прекалликреина предназначен для построения калибровочного графика, компонент контроля – для оценки достоверности результатов испытаний и построения контрольных карт. Анализ полученных карт для компонента контроля позволил оценить стабильность аналитической работы. **Выводы:** компоненты разработанных СО в сочетании с контрольными картами Шухарта позволяют не только определять содержание активатора прекалликреина, но и контролировать процесс анализа, оценивать его изменения, связанные со сменой серии реагентов. Компонент контроля позволяет оценивать стабильность аналитической работы и обеспечивает стандартность методики.

Ключевые слова: лекарственные препараты иммуноглобулинов и альбумина человека; активатор прекалликреина; прекалликреин человека; стандартизация; стандартный образец; аттестация; стабильность аналитической работы; контрольные карты Шухарта

Для цитирования: Корнилова О.Г., Кривых М.А., Воропаев А.А., Фадейкина О.В., Волкова Р.А. Стандартизация метода определения содержания активатора прекалликреина в лекарственных препаратах иммуноглобулинов и альбумина человека. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2022;22(1):49–59. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-1-49-59>

Standardisation of the method for prekallikrein activator determination in human immunoglobulin and albumin products

O.G. Kornilova ✉, M.A. Krivykh, A.A. Voropaev, O.V. Fadeikina, R.A. Volkova

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, 8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

✉ *Olga G. Kornilova; Kornilova@expmed.ru*

Resume

Assessment of prekallikrein content is essential for safety control of human immunoglobulin and albumin products. The inherent variability of human prekallikrein reagents and chromogenic substrates indicates the need for standardisation of the chromogenic assay, using the components of a reference standard (RS) not only for construction of calibration curves, but also for confirmation of validity, consistency, and reproducibility of results within different established ranges. **The aim of the study** was to improve the quality control of human plasma products in terms of prekallikrein activator content. **Materials and methods:** prekallikrein activator content was determined by the chromogenic assay according to the procedure described in General Monograph 1.8.2.0013.18 of the Russian Pharmacopoeia, using various prekallikrein reagents. An RS was developed in a spiking test, using human albumin solution and Hageman factor beta-fragment reagent. Shewhart control charts were prepared based on the results of determination of prekallikrein activator content in the RS control component. **Results:** a two-component RS for prekallikrein activator content with an assigned Hageman factor beta fragment content was developed using the spiking test. The authors substantiated the necessity of using a Russian-produced prekallikrein reagent as the RS component. The in-house reference standard IRS 42-28-445 was certified using all available human prekallikrein reagents, and the IRS 42-28-446 was certified using the prekallikrein reagent included in the kit. The certified prekallikrein activator content is: 51 IU in the batches 1 of IRS components intended for prekallikrein determination; 8.3–11.9 IU/mL in the IRS 42-28-445 control component, after reconstitution in 1.0 mL of purified water, and 5.4–6.6 IU/mL after reconstitution in 2.0 mL of purified water; and 9.1–11.1 IU/mL and 5.6–6.4 IU/mL in the IRS 42-28-446 control component after reconstitution in 1.0 mL and 2.0 mL of purified water, respectively. The IRS component intended for prekallikrein determination is designed for calibration curve construction, while the IRS control component is designed for assessing the validity of test results and preparation of control charts. The analysis of the control charts for the control component made it possible to evaluate the consistency of the analytical process. **Conclusions:** the components of the developed RSs in combination with Shewhart control charts allow for both determination of prekallikrein activator content, and control of the analytical process, as well as assessment of changes related to the replacement of the reagent batch. The RS control component allows for assessment of analytical process consistency and ensures the standardisation of the test procedure.

Key words: human immunoglobulin and albumin products; prekallikrein activator; human prekallikrein; standardisation; reference standard; certification; analytical process consistency; Shewhart control charts

For citation: Kornilova O.G., Krivykh M.A., Voropaev A.A., Fadeikina O.V., Volkova R.A. Standardisation of the method for prekallikrein activator determination in human immunoglobulin and albumin products. *BIOPreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2022;22(1):49–59. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-1-49-59>

Введение

Одной из возможных причин возникновения нежелательных реакций при инфузионной терапии лекарственными препаратами иммуноглобулинов (ЛП ИГЧ) и альбумина человека (ЛП АЧ) является гипотензивное действие активатора прекалликреина (АПК). Являясь активированным β -фрагментом фактора свертывания крови XII (фактора Хагемана), этот компонент плазмы крови человека в остаточном количестве может содержаться в готовом препарате и при внутривенном введении вызывать активацию и переход прекалликреина (ПК) в калликреин, который, в свою очередь, вызывает активацию кининового пути и синтез брадикинина, обладающего сосудорасширяющим действием [1]. Контроль остаточного содержания активатора прекалликреина в ЛП ИГЧ и ЛП АЧ¹, допустимым пределом которого является 35 МЕ/мл, осуществляется хромогенным методом посредством сравнения со стандартным образцом (СО), откалиброванным в международных единицах (МЕ)². Современные СО, применяемые в международной фармакопейной практике, представляют собой серию препарата АЧ с повышенным содержанием АПК, приближающимся к предельно допустимому в ЛП АЧ. В настоящее время разработано и аттестовано несколько СО АПК³, каждый из которых является средством передачи единицы величины, выраженной в МЕ, и используется для построения калибровочного графика⁴. Аtte-

стованная характеристика представляет собой среднее значение содержания АПК без указания допустимых отклонений. Хромогенный метод определения содержания АПК в ЛП ИГЧ и ЛП АЧ предусматривает использование биологического реагента ПК, стандартизация которого по всем свойствам невозможна. Существенное значение имеет концентрация хромогенного субстрата, соответствующая количеству синтезируемого калликреина при взаимодействии испытуемого образца и ПК. Кроме того, стабильность и воспроизводимость результатов этого метода контроля качества подвержена влиянию таких факторов, как соотношение образца и ПК в реакционной смеси, ионная сила и значение pH реакционной смеси, время и температура инкубации [2]. Фармакопейный метод предусматривает возможность выполнения различных методик, характеризующихся вариабельностью перечисленных параметров. Это обстоятельство указывает на необходимость стандартизации метода использованием компонентов СО не только для построения калибровочного графика, но и для подтверждения достоверности, стабильности и воспроизводимости полученных результатов в различных диапазонах в пределах регламентированных значений. Следить за возможными трендами в результатах испытаний и оперативно принимать меры для обеспечения надлежащего качества испытаний позволяют контрольные карты. Опыт использования

¹ Фармакопейная статья 3.3.2.0006.18 Альбумин человека. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

2.6.15. Prekallikrein activator 04/2016:20615. European Pharmacopoeia. 10th ed.; 2018.

² Общая фармакопейная статья 1.8.2.0013.18 Определение содержания активатора прекалликреина в лекарственных препаратах из плазмы крови человека. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

³ Non WHO Reference Material 1st British Reference preparation for prekallikrein activator (PKA). NIBSC code: 79/572. Instructions for use (Version 5.0, Dated 23/05/2012). <https://www.nibsc.org/documents/ifu/79-572.pdf>
Certificate prekallikrein activator. USP Catalog No. 1559709, Lot No. F034G0. <https://static.usp.org/pdf/EN/referenceStandards/certificates/1559709-F034G0.pdf>

Fox B, Ezeajughi E, Roberts G, Longstaff C, Rigsby P, Regourd E, Terao E. International collaborative study to calibrate proposed 3rd WHO international standard and Ph. Eur. biological reference preparation batch 7 for prekallikrein activator. Expert committee on biological standardization (WHO/BS/2019.2357). WHO; 2019. https://www.who.int/biologicals/expert_committee/BS.2019.2357_3rd_IS_PKA.pdf

⁴ Корнилова ОГ. Теоретическое и экспериментальное обоснование подходов к обеспечению специфической безопасности и стандартизации лекарственных препаратов иммуноглобулинов и альбумина человека: дис. ... д-ра фарм. наук. М.; 2021.

отечественного отраслевого стандартного образца (ОСО) ОСО 42-28-430 «Иммуноглобулин человека (антикомплементарная активность)» в совокупности с контрольными картами Шухарта⁵ наглядно продемонстрировал эффективность контроля испытаний ЛП ИГЧ по показателю «Антикомплементарная активность», а также оценки его изменения, связанного со сменой серии реагентов⁶. Один и тот же СО не может быть использован для целей калибровки и оценки пригодности системы / оценки приемлемости результатов испытаний⁷. Применяемые в международной практике СО позволяют стандартизировать качество ЛП по содержанию АПК, но оценить воспроизводимость и приемлемость результатов испытаний с их использованием невозможно.

Цель работы – совершенствование процедуры контроля качества препаратов из плазмы крови человека по содержанию активатора прекалликреина. Для достижения поставленной цели была решена задача разработки нового двухкомпонентного стандартного образца содержания активатора прекалликреина.

Материалы и методы

Материалы:

- реагент прекалликреин человека (производства Nyphen Biomed, кат. № PP501, серия F1700635; производства Coachrom Diagnostica, кат. № COA0022, серии 717551, 703168; производства Enzyme Research Laboratories, кат. № НРК 1302, серия НРК3930; производства EDM Millipore Corporation, кат. № 529583-1MG, серия 2941122; производства ООО Фирма «Технология-Стандарт», серии Д909059, E001017);
- хромогенный субстрат S-2320 (Chromogenix, серии 0286043, 0789373);
- международный стандартный образец активатора прекалликреина (2nd International standard for prekallikrein activator, NIBSC code: 02/168), аттестованное значение 29 МЕ;
- реагент β -фрагмента фактора Хагемана

(Human Coagulation Factor XIIa Beta, 100 mg, 1,09 mg/ml), Cell Sciences, CSI20178A, серия 4118110;

- альбумин человека, раствор для инфузий, 20%, отечественного производства, флаконы по 100 мл.

Методы

Для подготовки кандидатов в компоненты СО в альбумин человека, раствор для инфузий, 20% вносили расчетное количество реагента β -фрагмента фактора Хагемана, тщательно перемешивали, избегая вспенивания, и разливали по 1,0 мл в ампулы или флаконы.

Высушивание полученных образцов проводили в сушке лиофильной MSR 18, Uzifroid после предварительного замораживания при температуре минус 70 °С и сушке лиофильной Epsilon 2-4 LSC plus, Martin Christ в стандартных условиях. Точность розлива кандидата в СО во флаконы до высушивания определяли взвешиванием пустого и наполненного флакона. Определение средней массы и отклонение от средней массы лиофилизата проводили весовым методом⁸, содержание остаточной воды – методом К. Фишера⁹ и по потере в массе при высушивании¹⁰.

Содержание АПК определяли хромогенным методом кинетическим тестом и тестом по конечной точке в соответствии с общей фармакопейной статьей (ОФС) Государственной фармакопеи Российской Федерации ОФС.1.8.2.0013.18¹¹ с использованием анализатора иммунологического MultiskanGo (Thermo Fisher Scientific). Содержание АПК вычисляли с использованием методов построения калибровочной кривой (линейная зависимость скорости изменения оптической плотности в 1 минуту от концентрации АПК или оптической плотности от концентрации АПК) и параллельных шкал при доверительной вероятности 0,95. Расчет среднего арифметического (\bar{x}), стандартного отклонения (S_x), критерия Фишера (F_{exp}), относительное стандартное отклонение (RSD) выполняли с помощью формул и табличных данных с использованием програм-

⁵ ГОСТ Р ИСО 7870-1-2011. Статистические методы. Контрольные карты. Часть 1. Общие принципы. ГОСТ Р ИСО 7870-2-2015. Статистические методы. Контрольные карты. Часть 2. Контрольные карты Шухарта.

⁶ Корнилова О.Г. Теоретическое и экспериментальное обоснование ... дис. ... д-ра фарм. наук. М.; 2021.

⁷ ГОСТ ISO Guide 35-2015. Стандартные образцы. Общие и статистические принципы сертификации (аттестации).

⁸ Общая фармакопейная статья 1.4.2.0009.15 Однородность массы дозированных лекарственных форм. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

⁹ Общая фармакопейная статья 1.2.3.0002.15 Определение воды. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

¹⁰ Общая фармакопейная статья 1.2.1.0010.15 Потеря в массе при высушивании. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

¹¹ Общая фармакопейная статья 1.8.2.0013.18 Определение содержания активатора прекалликреина в лекарственных препаратах из плазмы крови человека. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

Таблица 1. Содержание активатора прекалликреина в экспериментальных образцах компонентов стандартного образца для определения содержания активатора прекалликреина**Table 1.** Prekallikrein activator content in the components of the prekallikrein activator reference standard

Наименование компонента стандартного образца <i>Reference standard component</i>	Концентрация реагента β -фрагмента фактора Хагемана, нг/мл ^а <i>Hageman factor β-fragment concentration, ng/mL^a</i>	Содержание активатора прекалликреина, МЕ/мл ^б <i>Prekallikrein activator content, IU/mL^b</i>		
		кинетический тест <i>kinetic assay</i>	тест по конечной точке <i>endpoint assay</i>	среднее значение <i>mean value</i>
Компонент для оценки содержания активатора прекалликреина <i>Component for determination of prekallikrein activator content</i>	16	37,4	38,7	38,0
	17	44,7	44,6	45,0
	20	53,3	53,8	54,0
	22	57,4	58,4	58,0
	30	97,0	99,1	98,0
Компонент контроля <i>Control component</i>	2,0	8,3±0,4	8,5±0,4	8,4±0,4
	2,5	10,1±1,6	10,6±1,5	10,4±1,4
	7,0	17,3±2,0	17,9±1,0	17,6±1,6
	9,2	21,7±0,6	22,3±0,4	21,9±0,8
	13,0	26,7±0,8	26,9±0,6	26,8±0,7

^а Расчетное значение.^б Для компонента для оценки содержания активатора прекалликреина указано среднее значение \bar{x} ($n = 3$); для компонента контроля — среднее значение и стандартное отклонение ($\bar{x} \pm S_x$) ($n = 3$).^а Calculated value.^б The table gives the mean value \bar{x} ($n = 3$) for the component for prekallikrein activator determination, and the mean value and standard deviation ($\bar{x} \pm S_x$) ($n = 3$) for the control component.

мы для статистического анализа MS Excel 7.0, а также программы «ПАРАЛАЙН».

По результатам определения содержания АПК в компоненте контроля осуществляли построение контрольных карт Шухарта¹².

Результаты и обсуждение

В исследованиях по стандартизации метода определения содержания АПК был обоснован двухкомпонентный СО в виде набора, включающего компонент с содержанием АПК более 35 МЕ/мл, который предназначен для построения калибровочного графика в методике определения АПК (компонент для оценки содержания АПК), и компонент с содержанием АПК менее 35 МЕ/мл, предназначенный для оценки стабильности аналитической работы (компонент контроля) [3]. Значение 35 МЕ/мл является предельно допустимым содержанием АПК в ЛП ИГЧ и ЛП АЧ и соответствует верхней границе калибровочного графика в пределах валидированного диапазона фармакопейного метода¹³. Получение компонентов СО содержания АПК осу-

ществляли добавлением очищенного реагента β -фрагмента фактора Хагемана в 20% раствор альбумина человека. Как видно из данных, представленных в таблице 1, внесение регламентированного количества реагента β -фрагмента фактора Хагемана позволяет получить экспериментальные образцы кандидатов в компоненты СО с заданным содержанием активатора прекалликреина. Кандидаты в компоненты СО содержания активатора прекалликреина после розлива по 1,0 мл в ампулы подвергали замораживанию при температуре не выше минус 70 °С и лиофильному высушиванию на установке для лиофильного высушивания Usifroid¹⁴. Образцы, полученные данным способом, характеризовались потерей в массе при высушивании до 2,2% и длительным временем растворения лиофилизата (до 35 мин). При использовании аппарата камерного типа Epsilon 2-4 LSC plus процесс лиофилизации кандидатов в компоненты СО, разлитых по 1,0 мл во флаконы, контролировали по температурному режиму, наличию вакуума и электропроводности материала.

¹² ГОСТ Р ИСО 7870-2-2015. Статистические методы. Контрольные карты. Часть 2. Контрольные карты Шухарта.¹³ Корнилова О.Г. Теоретическое и экспериментальное обоснование ... дис. ... д-ра фарм. наук. М.; 2021.¹⁴ Там же.

Таблица 2. Результаты определения характеристик кандидатов в компоненты стандартного образца содержания активатора прекалликреина**Table 2.** Test results for the components of the candidate reference standard for prekallikrein activator content

Наименование характеристики, единицы измерения <i>Parameters, units</i>	Наименование метода <i>Test method</i>	Значение характеристики для компонента стандартного образца, $\bar{x}/\bar{x} \pm S_x$, RSD (при необходимости) <i>Value obtained for the reference standard component, $\bar{x}/\bar{x} \pm S_x$, RSD (if necessary)</i>	
		компонент для оценки содержания активатора прекалликреина <i>component for determination of prekallikrein activator content</i>	компонент контроля <i>control component</i>
Средняя масса и отклонение от средней массы лиофилизата ($n = 10$) <i>Average mass and mass variation of the lyophilisate ($n = 10$)</i>	Весовой <i>Mass variation</i>	0,2063±0,0025 г RSD = 0,9%	0,2070±0,0036 г RSD = 1,7%
Вода ($n = 3$) <i>Water ($n = 3$)</i>	К. Фишера <i>K. Fischer</i>	0,29%	0,33%
Время получения восстановленного раствора ($n = 4$) <i>Reconstitution time ($n = 4$)</i>	Хронометрический <i>Chronometric</i>	11 мин <i>11 min</i>	12 мин <i>12 min</i>

По окончании лиофилизации укупоривание образцов под вакуумом резиновыми пробками осуществляли в камере сразу после высушивания. Остаточное содержание воды в образцах, высушенных в аппарате камерного типа, не превысило 0,33%, время получения восстановленного раствора сократилось до 11–12 мин, однородность серии кандидатов в компоненты СО подтвердили оценкой средней массы и отклонения от средней массы (табл. 2).

Унификация метода определения содержания АПК предопределяет необходимость использования всех доступных реагентов ПК для аттестации СО. В то же время использование реагента ПК одного производителя позволит уменьшить неопределенность аттестованного значения. С этой целью СО укомплектовали реагентом ПК отечественного производства. Установление аттестованного значения содержания АПК в компонентах СО проводили по результатам, полученным в одной лаборатории, с привлечением двух исследователей, хромогенным методом кинетическим тестом и тестом по конечной точке в соответствии с ОФС.1.8.2.0013.1815 с использованием всех доступных реагентов прекалликреина (для СО 42-28-445 «Набор для определения содержания активатора прекалликреина») и использованием реагента ПК, входящего в комплект набора (для СО 42-28-446 «Набор для определения содержания ак-

тиватора прекалликреина» (в комплекте с прекалликреином))¹⁶.

Использование компонента контроля целесообразно в диапазоне значений, наиболее близких к предполагаемому содержанию АПК в испытуемом образце. Для аттестации компонент для оценки содержания АПК восстанавливали в 1,0 мл воды очищенной, компонент контроля – в 1,0 и в 2,0 мл воды очищенной. Так как компонент для оценки содержания АПК используется для построения калибровочного графика, его аттестованное значение выражали средним значением; аттестованным значением компонента контроля считали диапазон, равный плюс/минус двум стандартным отклонениям от среднего значения (табл. 3, 4).

На основании результатов, представленных в таблице 3, серия 1 СО 42-28-445 была аттестована со значениями содержания активатора прекалликреина:

- компонент для оценки содержания АПК – 51 МЕ;
- компонент контроля: при восстановлении в 1,0 мл воды очищенной 8,3–11,9 МЕ/мл, при восстановлении в 2,0 мл воды очищенной 5,4–6,6 МЕ/мл (с доверительной вероятностью 0,95).

На основании результатов, представленных в таблице 4, серия 1 СО 42-28-446 была аттестована со значениями содержания активатора прекалликреина:

- компонент для оценки содержания АПК – 51 МЕ;

¹⁵ Общая фармакопейная статья 1.8.2.0013.18 Определение содержания активатора прекалликреина в лекарственных препаратах из плазмы крови человека. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4. М.; 2018.

¹⁶ Корнилова О.Г. Теоретическое и экспериментальное обоснование ... дис. ... д-ра фарм. наук. М.; 2021.

Таблица 3. Содержание активатора прекалликреина в компонентах ОСО 42-28-445 «Набор для определения содержания активатора прекалликреина»

Table 3. Prekallikrein activator content in the components of the IRS 42-28-445 "Kit for determination of prekallikrein activator content"

Наименование компонента <i>Component</i>	Содержание активатора прекалликреина, $\bar{x}/\bar{x}\pm S_x$, МЕ/мл ($p = 0,95$) ($n = 18$) <i>Prekallikrein activator content,</i> $\bar{x}/\bar{x}\pm S_x$, IU/mL ($p = 0,95$) ($n = 18$)			Коэффициент вариации, % <i>Coefficient of variation, %</i>
	кинетический тест <i>kinetic assay</i>	тест по конечной точке <i>endpoint assay</i>	среднее значение <i>mean value</i>	
для оценки содержания активатора прекалликреина <i>for prekallikrein activator determination</i>	50,9±0,7	51,0±1,4	51,0±1,6	3,1
для контроля (при восстановлении в 1,0 мл) <i>control (when reconstituted in 1.0 mL)</i>	10,1±0,9	10,1±0,8	10,1±0,9	8,5
контроля (при восстановлении в 2,0 мл) <i>control (when reconstituted in 2.0 mL)</i>	6,0±0,3	6,0±0,2	6,0±0,3	4,2

– компонент контроля: при восстановлении в 1,0 мл воды очищенной 9,1–11,1 МЕ/мл; при восстановлении в 2,0 мл воды очищенной 5,6–6,4 МЕ/мл (с доверительной вероятностью 0,95).

Результаты сравнительной оценки линейности и параллелизма линий регрессии для международного стандартного образца активатора прекалликреина и компонента для оценки содержания АПК разработанного нами СО (в обеих комплектациях) позволили сделать вывод об отсутствии статистически значимых различий между ними ($F_{\text{exp}} < F_{\text{theor}}$) (табл. 5).

Соответствие содержания АПК в компоненте контроля аттестованным значениям

свидетельствует о выполнении требований к критерию пригодности системы и является основанием для учета результатов испытаний исследуемых образцов. Инструментом статистического анализа процесса испытаний являются контрольные карты Шухарта индивидуальных значений (X-карта), представляющие собой графики, на которых по горизонтальной оси откладывают порядковый номер испытаний, а по вертикальной – результат испытаний.

Для оценки стабильности аналитической работы на карты наносят графическое обозначение аттестованного (среднего) значения анализируемого показателя в компоненте контроля стандартного образца (центральная линия),

Таблица 4. Содержание активатора прекалликреина в компонентах ОСО 42-28-446 «Набор для определения содержания активатора прекалликреина» (в комплекте с прекалликреином)

Table 4. Prekallikrein activator content in the components of the IRS 42-28-446 "Kit for determination of prekallikrein activator content" (supplied with prekallikrein)

Наименование компонента <i>Component</i>	Содержание активатора прекалликреина, $\bar{x}/\bar{x}\pm S_x$, МЕ/мл ($p = 0,95$) ($n = 18$) <i>Prekallikrein activator content,</i> $\bar{x}/\bar{x}\pm S_x$, IU/mL ($p = 0,95$) ($n = 18$)			Коэффициент вариации, % <i>Coefficient of variation, %</i>
	кинетический тест <i>kinetic assay</i>	тест по конечной точке <i>endpoint assay</i>	среднее значение <i>mean value</i>	
для оценки содержания активатора прекалликреина <i>for prekallikrein activator determination</i>	50,9±0,9	51,0±1,0	51,0±0,9	1,9
для контроля (при восстановлении в 1,0 мл) <i>control (when reconstituted in 1.0 mL)</i>	10,2±0,4	10,1±0,6	10,1±0,5	5,0
для контроля (при восстановлении в 2,0 мл) <i>control (when reconstituted in 2.0 mL)</i>	6,0±0,2	6,0±0,1	6,0±0,2	2,7

Таблица 5. Оценка зависимости изменения оптической плотности или оптической плотности от концентрации активатора прекалликреина в компонентах стандартного образца для определения содержания активатора прекалликреина¹⁷**Table 5.** Estimation of absorbance/change in absorbance as a function of prekallikrein activator concentration in the reference standard components for determination of prekallikrein activator content¹⁷

Наименование теста <i>Assay</i>	Реагент прекалликреина ^а <i>Prekallikrein reagent^а</i>	Уравнение линейной регрессии <i>Linear regression equation</i>	Коэффициент детерминации <i>Coefficient of determination</i>	Параллелизм <i>Parallelism</i>		Линейность <i>Linearity</i>	
				$F_{теор}$ $F_{теор}$	$F_{эксп}$ $F_{эксп}$	$F_{теор}$ $F_{теор}$	$F_{эксп}$ $F_{эксп}$
Кинетический тест <i>Kinetic assay</i>	1	$y=0,0021x+0,0016$	0,9942	9,55	0,00	9,01	0,65
	2	$y=0,0012x+0,0007$	0,9969	6,94	0,82	6,16	0,34
	3	$y=0,0005x+0,0002$	0,9993	6,94	0,05	6,16	0,67
	4	$y=0,0004x+0,0003$	0,9970	6,94	0,43	6,16	0,13
	5	$y=0,0017x+0,0039$	0,9984	5,59	1,21	4,35	2,79
Тест по конечной точке <i>Endpoint assay</i>	1	$y=0,054x+0,1111$	0,9902	9,55	0,00	9,01	0,65
	2	$y=0,0328x+0,0394$	0,9912	6,94	0,09	6,16	0,40
	3	$y=0,0149x+0,0686$	0,9975	9,55	0,00	9,28	0,18
	4	$y=0,0102x+0,0785$	0,9986	6,94	0,74	6,16	0,30
	5	$y=0,0235x+0,0228$	0,9929	5,32	0,26	3,84	2,58

^а Использованы реагенты прекалликреина, производства: 1 – Calbiochem, EMD Millipore Corporation; 2 – Enzyme Research Laboratories; 3 – Hyphen Biomed; 4 – CoaChrom Diagnostica; 5 – ООО Фирма «Технология-Стандарт».

^а Prekallikrein reagents produced by: 1–Calbiochem, EMD Millipore Corporation; 2–Enzyme Research Laboratories; 3–Hyphen Biomed; 4–CoaChrom Diagnostica; 5–“Tehnologiya-Standart” LLC.

а также линии, обозначающие контрольные границы на расстоянии \pm двух ($\pm 2S$) и \pm трех ($\pm 3S$) стандартных отклонений вверх и вниз от среднего значения. Выход результатов за контрольные границы и оценка расположения на карте точек, соответствующих результатам испытаний, должны анализироваться: например, расположение девяти результатов выше или ниже средней линии или шести возрастающих или уменьшающихся результатов подряд может свидетельствовать о появлении систематических влияющих факторов, которые должны быть выявлены¹⁸.

На рисунках 1 и 2 представлены результаты испытаний ЛП ИГЧ и ЛП АЧ по содержанию АПК с одновременным использованием компонента контроля ОСО 42-28-445-2020 (серия 1) или ОСО 42-28-446-2020 (серия 1). Указанная на каждой контрольной карте центральная

линия соответствует аттестованному значению содержания АПК в компоненте контроля для используемой серии СО, границы поля допуска, соответствуют двум и трем стандартным отклонениям аттестованного значения АПК.

Анализ графиков, представленных на рисунках 1А, 2А, с учетом используемых реагентов ПК различных производителей (точки с 1 по 4 – Hyphen Biomed, точки 5 и 6 – CoaChrom; точка 7 – ООО Фирма «Технология Стандарт», остальные точки – Enzym Research), и графиков, представленных на рисунках 1В, 2В, с учетом используемых серий реагента ПК (точки 1–6 – одна серия, точки 7–9 – другая серия), позволяет сделать вывод об отсутствии влияния смены производителя реагента или серии реагента ПК на стабильность результатов анализа.

С 01.07.2021 в соответствии с Приказом Минздрава России от 20.03.2020 № 202 био-

¹⁷ Там же.

¹⁸ ГОСТ Р ИСО 7870-2-2015. Статистические методы. Контрольные карты. Часть 2. Контрольные карты Шухарта.



Рис. 1. Контрольная карта для оценки стабильности процесса испытаний по показателю «Активатор прекалликреина» с использованием компонента контроля ОСО 42-28-445-2020 (А) и ОСО 42-28-446-2020 (В), восстановленного в 1,0 мл воды очищенной. +3S и +2S – верхние контрольные границы; -3S и -2S – нижние контрольные границы, CL – центральная линия.

Fig. 1. Control chart for assessing the analytical process consistency in terms of the “Prekallikrein activator” test parameter, using the control components of the IRS 42-28-445-2020 (A) and IRS 42-28-446-2020 (B), reconstituted in 1.0 mL of purified water. +3S and +2S—upper control limits; -3S and -2S—lower control limits, CL—centre line.

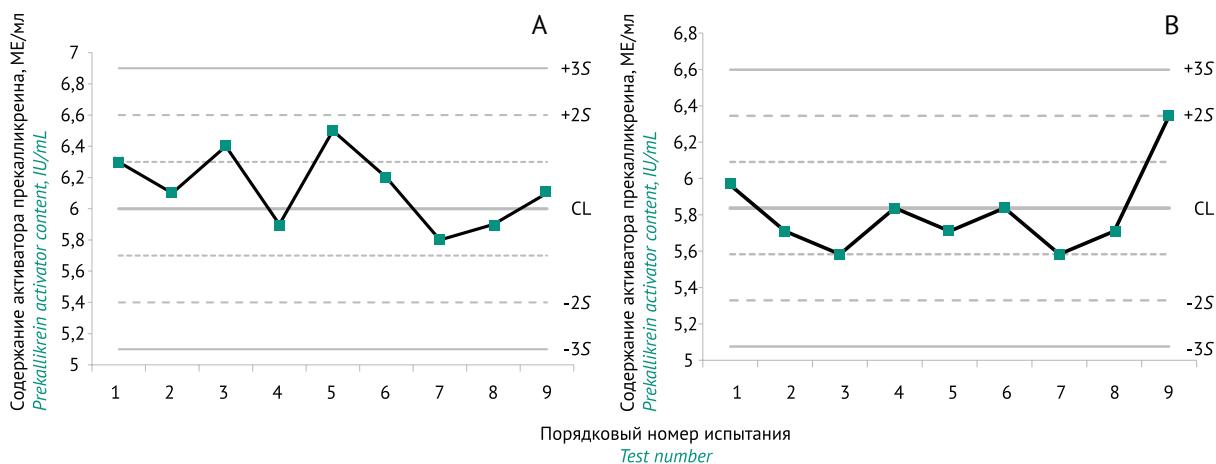


Рис. 2. Контрольная карта для оценки стабильности аналитической работы в испытаниях по показателю «Активатор прекалликреина» с использованием компонента контроля ОСО 42-28-445-2020 (А) и ОСО 42-28-446-2020 (В), восстановленного в 2,0 мл воды очищенной. +3S и +2S – верхние контрольные границы; -3S и -2S – нижние контрольные границы, CL – центральная линия.

Fig. 2. Control chart for assessing the analytical process consistency in terms of the “Prekallikrein activator” test parameter, using the control components of the IRS 42-28-445-2020 (A) and IRS 42-28-446-2020 (B), reconstituted in 2.0 mL of purified water. +3S and +2S—upper control limits; -3S and -2S—lower control limits, CL—centre line.

логические ОСО имеют статус Фармакопейных стандартных образцов (ФСО) Государственной фармакопеи Российской Федерации¹⁹. Реестровый номер стандартного образца «Набор для определения содержания активатора прекалликреина» ФСО 3.1.00445 (ОСО 42-28-445); стандартного образца «Набор для определения содержания активатора пре-

калликреина» (в комплекте с прекалликреином) ФСО 3.1.00446 (ОСО 42-28-446).

Заключение

Использование метода добавления высокоочищенного реагента β-фрагмента фактора Хагемана в 20% раствор альбумина человека позволило разработать новый двухкомпо-

¹⁹ Приказ Минздрава России от 20.03.2020 № 202 «О Метрологической службе Министерства здравоохранения Российской Федерации в сфере обращения лекарственных средств для медицинского применения» (вместе с «Положением о Метрологической службе Министерства здравоохранения Российской Федерации в сфере обращения лекарственных средств для медицинского применения»). http://www.regmed.ru/content/page/SPhRS_docs

нентный СО «Набор для определения содержания активатора прекалликреина» с регламентированным содержанием активатора прекалликреина более 35 МЕ/мл в компоненте для оценки содержания АПК и менее 35 МЕ/мл в компоненте контроля и усовершенствовать процедуру контроля качества препаратов из плазмы крови человека по содержанию АПК. Предложены две комплектации СО, одна из которых может использоваться с любым реагентом ПК (ФСО 3.1.00445 (ОСО 42-28-445)), вторая – с реагентом ПК, входящим в состав комплекта (ФСО 3.1.00446 (ОСО 42-28-446)). Аттестованное значение содержания активатора прекалликреина составило: в компоненте для оценки содержания активатора прекалликреина – 51 МЕ; в компоненте контроля ФСО 3.1.00445 (ОСО 42-28-445) при восстановлении в 1,0 мл воды очищен-

ной – 8,3–11,9 МЕ/мл, при восстановлении в 2,0 мл воды очищенной – 5,4–6,6 МЕ/мл; в компоненте контроля ФСО 3.1.00446 (ОСО 42-28-446) – 9,1–11,1 и 5,6–6,4 МЕ/мл соответственно. Указанная на каждой контрольной карте центральная линия соответствует аттестованному значению содержания АПК в компоненте контроля для используемой серии СО, границы поля допуска соответствуют двум и трем стандартным отклонениям аттестованного значения АПК.

Построение контрольных карт Шухарта для результата анализа СО для определения содержания АПК может быть использовано для оценки стабильности аналитической работы при проведении испытаний лекарственных препаратов иммуноглобулинов и альбумина человека по показателю качества «Активатор прекалликреина».

Литература/References

1. Messadi-Laribi E, Griol-Charhbil V, Gaies E, Vincent MP, Heudes D, Meneton P, et al. Cardioprotection and kallikrein-kinin system in acute myocardial ischaemia in mice. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2008;35(4):489–93. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2008.04902.x>
2. Корнилова ОГ, Кривых МА, Коновалова ЕС, Борисевич ИВ. Разработка методики определения содержания активатора прекалликреина в лекарственных препаратах иммуноглобулинов и альбумина человека. *Химико-фармацевтический журнал*. 2019;53(3):53–7 [Kornilova OG, Krivykh MA, Konovalova ES, Borisevich IV. Development of method for determining the content of prekalikrein activator in medicinal preparations of human immunoglobulins and albumin. *Khimiko-farmatsevticheskii zhurnal = Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2019;53(3):53–7 (In Russ.)] <https://doi.org/10.30906/0023-1134-2019-53-3-53-57>
3. Корнилова ОГ, Кривых МА, Воропаев АА, Хуснатдинова ЕА. Стандартный образец содержания активатора прекалликреина в препаратах крови человека. Патент Российской Федерации № 2756159; 2020. [Kornilova OG, Krivykh MA, Voropaev AA, Husnatdinova EA. A standard sample of the content of the prekalikrein activator in human blood preparations. Patent of the Russian Federation No. 2756159; 2020 (In Russ.)]

Вклад авторов. *О.Г. Корнилова* – идея исследования, проведение экспериментальных исследований, обобщение материала, написание, доработка текста рукописи; *М.А. Кривых* – сбор и систематизация данных, анализ и интерпретация результатов исследования; *А.А. Воропаев* – проведение экспериментальных исследований, обобщение материала, написание рукописи, оформление графического материала; *О.В. Фадейкина* – систематизация данных, анализ и интерпретация результатов исследования; *Р.А. Волкова* – анализ и интерпретация результатов исследования, доработка текста рукописи для публикации. **Благодарности.** Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00001-22-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121022000147-4). **Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Authors' contributions. *O.G. Kornilova*—elaboration of the study idea, conducting experimental research, summarising the obtained data, writing and editing of the paper; *M.A. Krivykh*—collection and systematisation of data, analysis and interpretation of the research results; *A.A. Voropaev*—conducting experimental research, summarising the obtained data, writing of the paper, preparation of the graphs; *O.V. Fadeikina*—systematisation of the obtained data, analysis and interpretation of the research results; *R.A. Volkova*—analysis and interpretation of the research results, revision and editing of the paper. **Acknowledgements.** The study reported in this publication was carried out as part of a publicly funded research project No. 056-00001-22-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. 121022000147-4). **Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Об авторах / Authors

Корнилова Ольга Геннадьевна, д-р фарм. наук.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1439-2052>
Kornilova@expmed.ru

Кривых Максим Андреевич, канд. фарм. наук.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2003-1264>
Krivykh@expmed.ru

Воропаев Андрей Андреевич. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5786-9159>
voropaev@expmed.ru

Фадеекина Ольга Васильевна, канд. биол. наук.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8473-7442>
Fadeikina@expmed.ru

Волкова Рауза Асхатовна, д-р биол. наук. ORCID:
<https://orcid.org/0000-0001-8698-2890>
Volkova@expmed.ru

Olga G. Kornilova, Dr. Sci. (Pharm.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1439-2052>
Kornilova@expmed.ru

Maksim A. Krivykh, Cand. Sci. (Pharm.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2003-1264>
Krivykh@expmed.ru

Andrey A. Voropaev. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5786-9159>
voropaev@expmed.ru

Olga V. Fadeikina, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8473-7442>
Fadeikina@expmed.ru

Rausa A. Volkova, Dr. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8698-2890>
Volkova@expmed.ru

Поступила 26.08.2021

После доработки 15.02.2022

Принята к публикации 11.03.2022

Received 26 August 2021

Revised 15 February 2022

Accepted 11 March 2022