



Prüfmethoden

Wertbestimmung von Heparin-Natrium

Eine neue Prüfmethode ermöglicht, die Aktivität des Heparins über die Eigenschaft, die gerinnungsfördernde Wirkung von Faktor IIa zu inhibieren, zu bestimmen. Die Vorteile, die diese im Vergleich zur Clotting-Methode bietet, sind erheblich.

Die Hämostase (Blutgerinnung/-stillung) ist ein lebenswichtiger Prozess, der den übermäßigen Austritt von Blut bei Verletzungen aus dem Blutkreislauf verhindert. Ein Teil der Hämostase setzt an der Gerinnungskaskade an und ist durch die Bildung von Fibrin-Fäden für die direkte Blutgerinnung verantwortlich.

Hierbei spielt die Aktivierung von etwa einem Dutzend im Blutplasma enthaltenen Gerinnungsfaktoren eine wichtige Rolle. Dieser Prozess wird auch von Inhibitoren kontrolliert, zu denen als wichtigster das Antithrombin zählt. Durch die Komplexbildung mit verschiedenen Gerinnungsfaktoren (z. B. IIa, IXa, Xa, XIa) hemmt er deren Aktivität und damit die Bildung von Fibrin. Dieser Mechanismus ist wichtig,

damit die Blutung des Gefäßes auch ortsspezifisch im Körper bleibt und es nicht zu ungehemmten Blutungen kommt. Diese hemmende Wirkung vom Antithrombin wird von Heparin verstärkt.

Heparine sind aus tierischem Gewebe, vor allem aus der Schweinemucosa, gewonnene Polysaccharide und werden durch ihre blutgerinnende Wirkung auch therapeutisch angewandt, unter anderem zur Prophylaxe und Therapie von Thrombosen, oder um das Gerinnen von Blutproben zu vermeiden.

Es gibt zwei Formen von Heparin, die die inhibitorische Aktivität des Antithrombins beschleunigen. Der Mechanismus der Komplexbildung mit den Zielenzymen ist allerdings unterschiedlich.

Das unfraktionierte Heparin (UFH) besitzt Bindungsstellen für Faktor IIa (Thrombin) und Antithrombin. Faktor IIa ist das zentrale Gerinnungsenzym, das die proteolytische Spaltung von Fibrinogen zu Fibrin katalysiert. Durch die Bindung von Antithrombin und Faktor IIa an das unfraktionierte Heparin kommt es durch die damit verbundene Konformationsänderung zur schnellen Komplexbildung zwischen Faktor IIa und Antithrombin. Der UFH-Antithrombin-Komplex hemmt ebenfalls den Gerinnungsfaktor Xa, wobei keine direkte Interaktion zwischen UFH und Faktor Xa stattfindet, sondern Antithrombin mit dem Faktor Xa interagiert.

Eine weitere Form von Heparin ist das niedermolekulare Heparin (LMWH), das durch

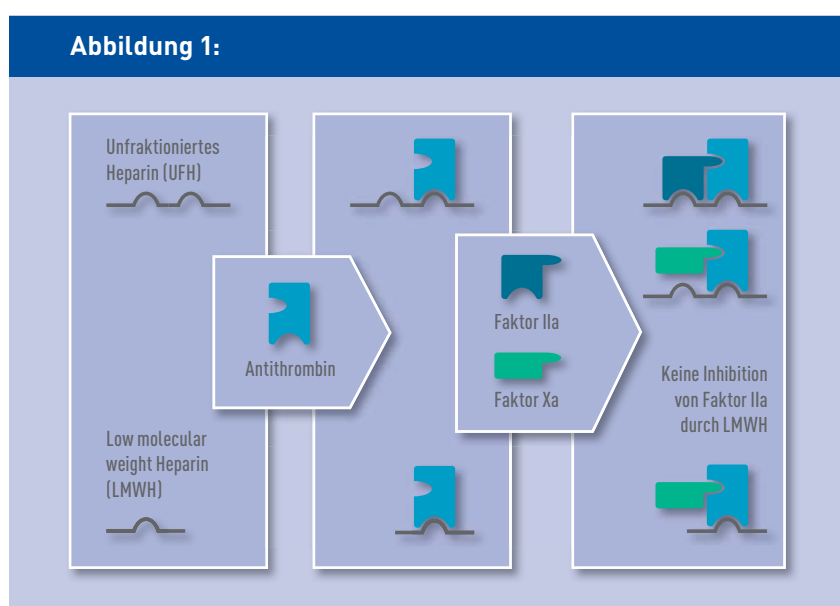


den begrenzten Abbau von UFH entsteht. Dieses wesentlich kürzere Molekül besitzt ebenfalls eine Bindungsstelle für Antithrombin, jedoch keine für Faktor IIa. Die Hemmung von Faktor IIa läuft deshalb in Gegenwart von niedermolekularem Heparin nur langsam ab, während die Hemmung von Faktor Xa ebenso wie durch das unfraktionierte Heparin stark beschleunigt wird (siehe Abbildung 1).

Um die Aktivität von Heparin-Natrium in Rohstoffen oder in Fertigprodukten zu bestimmen, schrieb das Europäische Arzneibuch bis Dezember 2014 eine Methode vor, bei der die gerinnungshemmenden Eigenschaften von Heparin über die Verzögerung der Gerinnung von recalcifiziertem Citratplasma ermittelt wird (Kapitel 2.7.5, Clotting-Methode).

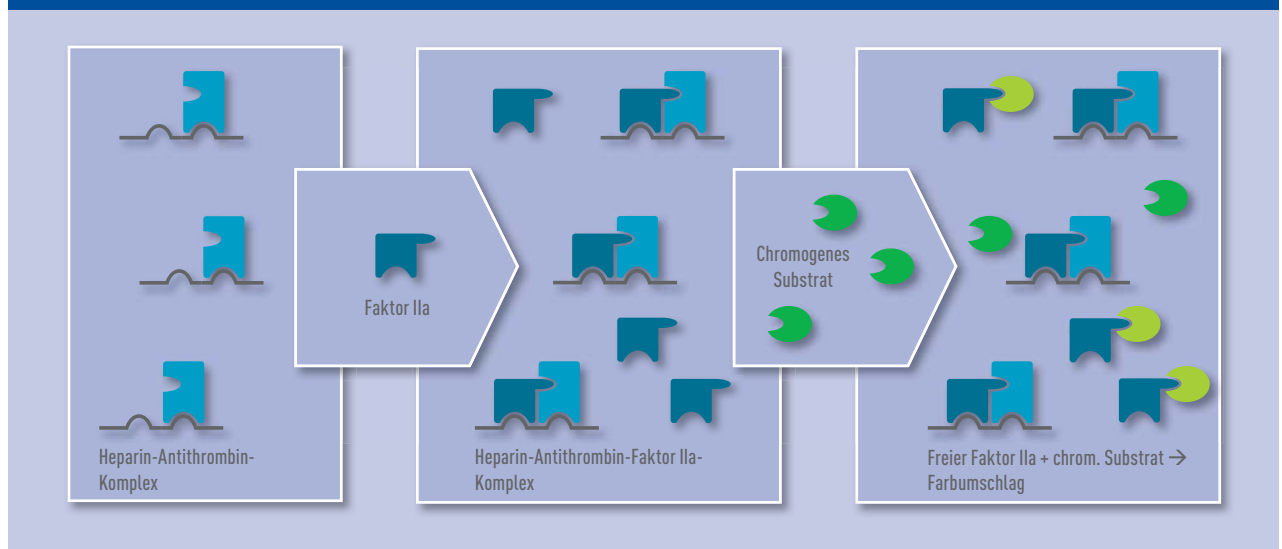
Gemäß dieser Vorschrift wird die Aktivität des Heparin-Natrium bestimmt, indem die Zeit bis zur Bildung der ersten Fibrinfäden gemessen wird. Ausgelöst wird die Gerinnungskaskade durch die Zugabe von Oberflächenaktivatoren und Calciumionen zu Plasma und der zu untersuchenden Prüfsbstanz.

Abbildung 1:



In der Abbildung 1 ist schematisch dargestellt, wie die Hemmung von Faktor IIa in Gegenwart des niedermolekularen Heparins langsam abläuft, während die Hemmung von Faktor Xa ebenso wie durch das unfraktionierte Heparin stark beschleunigt wird.

Abbildung 2:



Die Abbildung 2 zeigt schematisch das Testdesign der neuen Prüfmethode am Beispiel Faktor IIa.

Der Überschuss des Faktor IIa bzw. Xa, der nicht im Komplex vorliegt, spaltet das chromogene Substrat.

So werden die aktiven Faktoren über den Farbumschlag gemessen.

Seit Januar 2015 ist im Kapitel 2.7.5 (Ph. Eur. 8.3) eine neue Prüfmethode verankert, bei der die Aktivität des Heparins über die Eigenschaft, die gerinnungsfördernde Wirkung von Faktor IIa zu inhibieren, *in vitro* bestimmt wird. Zudem ist es mit der neuen Methode möglich, über die Bestimmung der Interaktion von Heparin mit dem Faktor Xa auch Aussagen über die Reinheit bzw. Identität des Heparins zu machen.

Die neue Heparinbestimmung lässt sich in zwei Prüfverfahren – Bestimmung der Anti-Faktor IIa- (Thrombin) und Anti-Faktor-Xa-Aktivität – untergliedern. Dabei werden die Faktoren IIa (Thrombin) und Xa im Überschuss zur Heparinlösung gegeben. Sie bilden dann mit dem verfügbaren Heparin Komplexe (siehe Abbildung 1). Da sie die Eigenschaft haben, ein chromogenes Substrat zu spalten, werden die nicht im Komplex vorliegenden und daher aktiven Faktoren IIa und Xa über einen Farbumschlag gemessen (siehe Abbildung 2).

Dieser wird photometrisch durch eine Absorptionsmessung bestimmt, so kann die Aktivität des Heparins ermittelt werden. Für die Aktivitätsbestimmung von Heparin-Natrium ist in der Ph. Eur. die Bestimmung über den Faktor IIa (Thrombin) vorgeschrieben.

Die Bestimmung der Identität B des Heparins erfolgt über Faktor Xa und Faktor IIa, indem die Ratio aus Anti-Faktor Xa- und Anti-Faktor IIa-Aktivität ermittelt wird. Liegt diese innerhalb des im Arzneibuch angegebenen Bereichs (0,9 bis 1,1), geht man davon aus, dass es sich um unfraktioniertes Heparin handelt. Liegt der Wert außerhalb dieser Grenzen, liegt ein niedermolekulares bzw. verunreinigtes Heparin vor.

Die neue Methode bietet zahlreiche Vorteile gegenüber dem Clotting-Verfahren. Beim chromogenen Verfahren wird die direkte Interaktion von Heparin mit Faktor IIa bzw. Faktor Xa gemessen. Im Gegensatz hierzu wird bei der Clotting-Methode die Heparin-Aktivität indirekt – über die gerinnungsverzögernde Wirkung bis zum Einsetzen der Fibrinbildung – bestimmt. Folglich ist die neue Methode für Heparin-Natrium spezifischer und ermöglicht zudem Aussagen über die Reinheit des Heparins. Letzteres ist vor allem vor dem Hintergrund von möglichen Verunreinigungen etwa durch übersulfatiertes Chondroitinsulfat (OSCS) von großem Interesse.

Die Clotting-Methode ist seit langem im Leistungsspektrum der Labor L+S AG zu finden. Auch weiterhin werden wir sie unseren Kunden zur Bestimmung von Rohstoffen und Fertigarzneimitteln anbieten.

Darüber hinaus freuen wir uns, Ihnen zukünftig auch das neu in der Ph. Eur. 8.3 vorgeschriebene, chromogene Verfahren anbieten zu können. Haben wir Ihr Interesse zu der neuen Aktivitäts- und Identitätsprüfung von Heparin geweckt? Oder haben Sie spezielle Fragen zur neuen Methode? Dann zögern Sie nicht und kontaktieren Sie uns.



Dr. Nadine Frölich
Abteilungsleiterin
Fon: +49 (0)97 08/91 00-588
nadine.froelich@labor-ls.de



Dr. Michaela Weigand
Wertbestimmung
Fon: +49 (0)97 08/91 00-587
michaela.weigand@labor-ls.de

