**Методы количественного ОФС**

**определения гепарина Вводится впервые**

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на методы количественного определения гепарина, как нефракционированного (НФГ), так и низкомолекулярного (НМГ).

В зависимости от техники постановки анализа, приведенные в данной статье объемы реагентов могут быть изменены, но с соблюдением соответствующих соотношений (пропорций).

ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Антикоагулянтное действие гепарина реализуется за счет взаимодействия с антитромбином III (АТ) – основным ингибитором тромбина (фактор IIа) и других активных форм факторов свертывания крови (преимущественно, фактора Xa). Гепарин связывается с АТ, благодаря наличию специфической последовательности пентасахаридов. В результате, активированный таким образом АТ взаимодействует с факторами IIа и Xa, что приводит к увеличению скорости их инактивирования более чем в 1000 раз.

Минимальный участок гепарина, необходимый для ингибирования АТ -ном фактора IIа, известен как С-домен и имеет примерную молекулярную массу 5400 Да. Хотя увеличение АТ-ой инактивации фактора Xa также зависит от молекулярной массы, дополнительные сахаридные единицы C-домена не являются существенными, и гепарин с молекулярной массой менее 5400 Да может усиливать инактивацию фактора Xa АТ-ом. В этой связи, фракции гепарина с молекулярной массой менее 5400 Да после комплексообразования с АТ ингибируют преимущественно фактор Ха, а непосредственно на фактор IIа влияют значительно меньше, в то время как гепарины с большей массой инактивируют и фактор IIа (антиIIа активность) и фактор Xa (антиХа активность).

Это различие в действии гепаринов оценивают по отношению активностей антиXa/антиIIа. Так, для препаратов НФГ это отношение составляет около 1, а для НМГ – более 1,5.

Основные методы количественного определения гепарина в фармацевтических субстанциях и лекарственных препаратах заключаются в установлении соответствующей активности (антиIIа или антиXa) гепарина или установлении его способности удлинять время свертывания плазмы крови.

ХРОМОГЕННЫЕ МЕТОДЫ

Хромогенные методы используют для определения ингибирующей активности фактора Ха и фактора IIа для НФГ и НМГ. Они основаны на измерении остаточной амидолитической активности факторов Ха или IIa после катализируемой гепарином инактивации их АТ-ном. Амидолитическую активность определяют с помощью специфичных для фактора Ха или IIa хромогенных субстратов. При этом количество отщепляемого от субстрата *п*-нитроанилина обратно пропорционально активности гепарина. Тест проводят в условиях, при которых фактическая скорость инактивации фермента связана линейной зависимостью с содержанием гепарина. Необходимо учитывать, что температура и время реакции, правильное дозирование и порядок добавления реагентов являются важными факторами для оптимального выполнения анализа. Анализ анти-IIа и анти-Xa активностей выполняют путем определения поглощения (метод конечной точки) или изменения поглощения в минуту (кинетический метод).

При проведении испытаний допускается использование специальных тестовых наборов.

**Определение анти-IIа активности НФГ.**

*Растворы стандартного и испытуемого образцов.* Готовят 4 независимые серии растворов по 4 разведения в трис – EDTA – BSA буферном растворе рН 8,4 (2) для испытуемого образца, подлежащего исследованию, и стандартного образца НФГ. Диапазон концентраций должен быть в пределах 0,005-0,03 МЕ/мл, а выбранные разведения должны иметь линейную зависимость оптической плотности от логарифма концентрации. Шаг разведения (отношение концентрации предшествующего раствора Sn или Tn к концентрации последующего раствора Sn+1 или Tn+1, соответственно) должен быть постоянным и одинаковым для растворов стандартного и испытуемого образца. Концентрации растворов стандартного образца и предполагаемые концентрации испытуемого образца, рассчитанные исходя из заявленной активности (*A*T), должны быть одинаковы.

*Методика*. Маркируют 16 пробирок для растворов испытуемого образца и 16 пробирок для растворов стандартного образца: Т1, Т2, Т3, Т4 для каждой из 4 серий растворов испытуемого образца и S1, S2, S3, S4 для каждой из 4 серий растворов стандартного образца. К каждой из 32 пробирок добавляют по 100 мкл раствора антитромбина III (1)и по 50 мкл соответствующего раствора испытуемого или стандартного образца. После каждого добавления смешивают, не допуская образования пузырьков. Выдерживают пробирки в 2 последовательных сериях при 37 °С (на водяной бане или нагревательном блоке) в следующем порядке: S1, S2, S3, S4, T1, T2, T3, T4, T1, T2, T3, T4, S1, S2, S3, S4, в течение 1 мин и добавляют в каждую пробирку по 25 мкл раствора человеческого тромбина (1). Инкубируют ровно 1 мин и добавляют по 50 мкл хромогенного субстрата, специфичного к фактору IIа в концентрации пригодной для анализа (например, 1,25 мМ раствор D-фенилаланин-L-пипеколил-L-аргинин-4-нитроанилида дигидрохлорид в воде).

В случае кинетического метода измеряют изменение оптической плотности в минуту при 405 нм.

Для метода конечной точки останавливают реакцию, спустя ровно 4 мин, путем добавления 50 мкл уксусной кислоты разведённой 20 %. Оценивают, насколько ровно 4 мин инкубации с хромогенным субстратом дает оптимальное значение оптической плотности и, при необходимости, оптимизируют инкубационный период, чтобы обеспечить наилучшую зависимость. Затем измеряют оптическую плотность при 405 нм.

Определяют холостую амидолитическую активность в начале и в конце эксперимента аналогичным образом, используя трис – EDTA – BSA буферный раствор рН 8,4 (2) вместо растворов стандартного и испытуемого образцов. Холостые значения не должны отличаться между собой более чем на 0,05 абсорбционных единиц.

*Расчеты.* Расчет активности проводят с использованием модели параллельных линий. Для полученных значений проводят проверку достоверности результатов испытания, используя дисперсионный анализ.

Рассчитывают средние значения оптической плотности (*A*) (в случае кинетического метода средние значения скорости изменения оптической плотность в минуту) для каждого разведения стандартного образца и испытуемого образца, их сумму и линейный контраст по формулам, приведеным в табл.1.

Таблица 1.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Параметр (величина) | Растворы стандартного образца | Растворы испытуемого образца |
| Среднее значение *А* растворов с минимальной концентрацией S4 и Т4  | *A*S4 | *A*T4 |
| Среднее значение *А* растворов с концентрацией S3 и Т3  | *A*S3 | *A*T3 |
| Среднее значение *А* растворов с концентрацией S2 и Т2  | *A*S2 | *A*T2 |
| Среднее значение *А* растворов с максимальной концентрацией S1 и Т1  | *A*S1 | *A*T1 |
| Сумма оптических плотностей | *PS* = *A*S4 + *A*S3 + *A*S2 + *A*S1 | *PT* = *A*T4 + *A*T3 + *A*T2 + *A*T1 |
| Линейный контраст  | *LS* = 1×*A*S4 + 2×*A*S3 + 3×*A*S2 + 4×*A*S1 -  | *LT* = 1×*A*T4 + 2×*A*T3 + 3×*A*T2 + 4×*A*T1 -  |

*d* – количество концентраций (разведений) в каждой серии стандартного (испытуемого) образца. *d* = 4 и для стандартного, и для испытуемого образцов.

Рассчитывают дополнительные параметры для дисперсионного анализа:

 , где

*n* – количество повторений испытаний для каждой концентрации (количество серий), *n* = 4;

*h* – количество образцов, используемых при количественном определении, *h* = 2 (один стандартный образец и один испытуемый образец).

Рассчитывают сумму квадратов и число степеней свободы по формулам, приведенным в табл.2.

Таблица 2.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Источник вариации | Степень свободы *f*  | Сумма квадратов |
| Образцы  | *h* – 1 = 1 |   |
| Линейная регрессия | 1 |   |
| Непараллельность | *h* – 1 = 1 |   |
| Нелинейность | *h* × (*d* – 2) = 4  |  |
| Группы (разведения)  | *h × d –*1*=*7 |   |
| Остаточная вариация  | *h*×*d*×(*n* *–*1)*=*24 |  |
| Общая вариация | *n*× *h × d –*1*=*31 |   |

*A* – единичное значение оптической плотности, измеренное при количественном определении;

 – среднее значение оптической плотности, рассчитанное для всех измерений при количественном определении.

Находят значения дисперсии и F-критерия в соответствие с формулами, приведенными в табл. 3.

Таблица 3.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Источник вариации | Дисперсия  | F-критерий  | Критическое значение F (*p* = 0,05; *f*1, *f*2) |
| Линейная регрессия |   |  | 4,26(*f*1 =1, *f*2 = 24)  |
| Непараллельность |   |   | 4,26 (*f*1 =1, *f*2 = 24) |
| Нелинейность  |  |   | 2,78(*f*1 =4, *f*2 = 24) |
| Остаточная вариация |   | - | - |

Сравнивают найденные значения F-критерия с критическими значениями F-критерия. Полученные результаты количественного определения считают достоверными если:

* для источника вариации «Линейная регрессия» найденное значение F-критерия больше, чем критическое значение F-критерия;
* для источника вариации «Непараллельность» найденное значение F-критерия меньше, чем критическое значение F-критерия;
* для источника вариации «Нелинейность» найденное значение F-критерия меньше, чем критическое значение F-критерия;

После подтверждения достоверности результатов рассчитывают общий для всех прямых угловой коэффициент:

, где

*I* – натуральный логарифм значения шага разведения.

Натуральный логарифм отношения значения установленной (измеренной) активности испытуемого образца (*R*T) к значению заявленной активности испытуемого образца(*A*T) вычисляют по формуле:

.

Установленную (измеренную) активность испытуемого образца рассчитывают по формуле:

.

При необходимости вычисляют доверительный интервал для полученного значения.

или

 , где

 ,

*t* – критерий Стьюдента при числе степеней свободы, равному числу степеней свободы остаточной погрешности (*f* = 24) при p = 0,05.

Приведенные выше расчеты можно проводить с использованием специализированного программного обеспечения. В некоторых случаях для получения линейной зависимости может потребоваться логарифмирование значений оптической плотности.

В случае потери одного или нескольких единичных значений, не связанной с методикой количественного определения (например, сбой в работе многоканальной пипетки и т.п.), допускается замена потерянного значения рассчитанным значением. Потерю экспериментального значения учитывают, уменьшая число степеней свободы общей погрешности и число степеней свободы остаточной погрешности на число потерянных результатов. Отсутствующее значение рассчитывают как среднее арифметическое всех других результатов, полученных для данной концентрации (разведения) раствора.

Для фармацевтических субстанций полученную активность выражают в МЕ/мг (в пересчете на сухое вещество), для лекарственных препаратов в виде растворов в МЕ/мл.

**Определение анти-Ха активности НФГ.** Определение анти-Ха активности проводят с целью определения соотношения активности анти-Ха активности к анти-IIа активности.

*Стандартные и испытуемые растворы.*

Готовят 4 независимые серии растворов по 4 разведения в трис – EDTA – BSA буферном растворе рН 8,4 (2) для испытуемого образца, подлежащего исследованию, и стандартного образца НФГ. Диапазон концентраций должен быть в пределах 0,03-0,375 МЕ/мл, а выбранные разведения должны иметь линейную зависимость оптической плотности от логарифма концентрации. Шаг разведения (отношение концентрации предшествующего раствора Sn или Tn к концентрации последующего раствора Sn+1 или Tn+1, соответственно) должен быть постоянным и одинаковым для растворов стандартного и испытуемого образца. Концентрации растворов стандартного образца и предполагаемые концентрации испытуемого образца, рассчитанные исходя из заявленной активности (*A*T), должны быть одинаковы.

*Методика*. Маркируют 16 пробирок для растворов испытуемого образца и 16 пробирок для растворов стандартного образца: Т1, Т2, Т3, Т4 для каждой из 4 серий растворов испытуемого образца и S1, S2, S3, S4 для каждой из 4 серий растворов стандартного образца. К каждой из 32 пробирок добавляют по 50 мкл раствора антитромбина III (2) и по 50 мкл соответствующего раствора испытуемого или стандартного образца. После каждого добавления смешивают, не допуская образования пузырьков. Выдерживают пробирки в 2 последовательных сериях при 37 °С (на водяной бане или нагревательном блоке) в следующем порядке: S1, S2, S3, S4, T1, T2, T3, T4, T1, T2, T3, T4, S1, S2, S3, S4, в течение 1 мин и добавляют в каждую пробирку по 100 мкл раствора фактора Ха (1). Инкубируют ровно 2 мин и добавляют по 100 мкл хромогенного субстрата, специфичного к фактору Ха в концентрации пригодной для анализа (например, 1 мМ раствор N-α-бензилоксикарбонил-D-аргинил-L-глицил-L-аргинин-4-нитроанилида дигидрохлорид в воде).

В случае кинетического метода измеряют изменение оптической плотности в минуту при 405 нм.

Для метода конечной точки останавливают реакцию, спустя ровно 4 мин, путем добавления 50 мкл уксусной кислоты разведённой 20 %. Оценивают, насколько ровно 4 мин инкубации с хромогенным субстратом дает оптимальное значение оптической плотности и, при необходимости, оптимизируют инкубационный период, чтобы обеспечить наилучшую зависимость. Затем измеряют оптическую плотность при 405 нм.

Определяют холостую амидолитическую активность в начале и в конце эксперимента аналогичным образом, используя трис – EDTA – BSA буферный раствор рН 8,4 (2) вместо растворов стандартного и испытуемого образцов. Холостые значения не должны отличаться между собой более чем на 0,05 абсорбционных единиц.

*Расчеты.* Проводят по аналогии с определением анти-IIа активности НФГ.

В некоторых случаях для получения линейной зависимости может потребоваться логарифмирование значений оптической плотности.

Для фармацевтических субстанций полученную активность выражают в МЕ/мг (в пересчете на сухое вещество), для лекарственных препаратов в виде растворов в МЕ/мл.

**Определение анти-IIа активности НМГ.**

*Растворы стандартного и испытуемого образцов.*

Готовят 4 независимые серии по 4 разведения в трис(гидроксиметил)аминометана – натрия хлорида буферном растворе рН 7,4 (2) для испытуемого образца, подлежащего исследованию, и стандартного образца НМГ. Диапазон концентраций должен быть в пределах 0,015-0,075 МЕ/мл, а выбранные разведения должны иметь линейную зависимость оптической плотности от логарифма концентрации. Шаг разведения (отношение концентрации предшествующего раствора Sn или Tn к концентрации последующего раствора Sn+1 или Tn+1, соответственно) должен быть постоянным и одинаковым для растворов стандартного и испытуемого образца. Концентрации растворов стандартного образца и предполагаемые концентрации испытуемого образца, рассчитанные исходя из заявленной активности (*A*T), должны быть одинаковы.

*Методика*. Маркируют 16 пробирок для растворов испытуемого образца и 16 пробирок для растворов стандартного образца: Т1, Т2, Т3, Т4 для каждой из 4 серий растворов испытуемого образца и S1, S2, S3, S4 для каждой из 4 серий растворов стандартного образца. К каждой из 32 пробирок добавляют по 50 мкл раствора антитромбина III (3) и по 50 мкл соответствующего раствора испытуемого или стандартного образца. После каждого добавления смешивают, не допуская образования пузырьков. Выдерживают пробирки в 2 последовательных сериях при 37 °С (на водяной бане или нагревательном блоке) в следующем порядке: S1, S2, S3, S4, T1, T2, T3, T4, T1, T2, T3, T4, S1, S2, S3, S4, в течение 1 мин и добавляют в каждую пробирку по 100 мкл раствор человеческого тромбина (2). Инкубируют ровно 1 мин и добавляют по 100 мкл хромогенного субстрата, специфичного к фактору IIа в концентрации пригодной для анализа (например, 1,25 мМ раствор D-фенилаланин-L-пипеколил-L-аргинин-4-нитроанилида дигидрохлорид в воде).

В случае кинетического метода измеряют изменение оптической плотности в минуту при 405 нм.

Для метода конечной точки останавливают реакцию, спустя ровно 4 мин, путем добавления 250 мкл уксусной кислоты разведённой 42 %. Оценивают, насколько ровно 4 мин инкубации с хромогенным субстратом дает оптимальное значение оптической плотности и, при необходимости, оптимизируют инкубационный период, чтобы обеспечить наилучшую зависимость. Затем измеряют оптическую плотность при 405 нм.

Определяют холостую амидолитическую активность в начале и в конце эксперимента аналогичным образом, используя трис(гидроксиметил)аминометана – натрия хлорида буферный раствор рН 7,4 (2) вместо растворов стандартного и испытуемого образцов. Холостые значения не должны отличаться между собой более чем на 0,05 абсорбционных единиц.

*Расчеты.* Проводят по аналогии с определением анти-IIа активности НФГ.

В некоторых случаях для получения линейной зависимости может потребоваться логарифмирование значений оптической плотности.

Для фармацевтических субстанций полученную активность выражают в МЕ/мг (в пересчете на сухое вещество), для лекарственных препаратов в виде растворов в МЕ/мл.

**Определение анти-Xа активности НМГ.**

*Растворы стандартного и испытуемого образцов.* Готовят 4 независимые серии по 4 разведения в трис(гидроксиметил)аминометана – натрия хлорида буферном растворе рН 7,4 (2) для испытуемого образца, подлежащего исследованию, и стандартного образца НМГ. Диапазон концентраций должен быть в пределах 0,025-0,2 МЕ/мл, а выбранные разведения должны иметь линейную зависимость оптической плотности от логарифма концентрации. Шаг разведения (отношение концентрации предшествующего раствора Sn или Tn к концентрации последующего раствора Sn+1 или Tn+1, соответственно) должен быть постоянным и одинаковым для растворов стандартного и испытуемого образца. Концентрации растворов стандартного образца и предполагаемые концентрации испытуемого образца, рассчитанные исходя из заявленной активности (*A*T), должны быть одинаковы.

*Методика*. Маркируют 16 пробирок для растворов испытуемого образца и 16 пробирок для растворов стандартного образца: Т1, Т2, Т3, Т4 для каждой из 4 серий растворов испытуемого образца и S1, S2, S3, S4 для каждой из 4 серий растворов стандартного образца. К каждой из 32 пробирок добавляют по 50 мкл раствора антитромбина III (3) и по 50 мкл соответствующего раствора испытуемого или стандартного образца. После каждого добавления смешивают, не допуская образования пузырьков. Выдерживают пробирки в 2 последовательных сериях при 37 °С (на водяной бане или нагревательном блоке) в следующем порядке: S1, S2, S3, S4, T1, T2, T3, T4, T1, T2, T3, T4, S1, S2, S3, S4, в течение 1 мин и добавляют в каждую пробирку по 100 мкл раствора фактора Ха (2). Инкубируют ровно 1 мин и добавляют по 100 мкл хромогенного субстрата, специфичного к фактору Ха в концентрации пригодной для анализа (например, 1,25 мМ раствор N-α-бензилоксикарбонил-D-аргинил-L-глицил-L-аргинин-4-нитроанилида дигидрохлорид в воде).

В случае кинетического метода измеряют изменение оптической плотности в минуту при 405 нм.

Для метода конечной точки останавливают реакцию, спустя ровно 4 мин, путем добавления 250 мкл уксусной кислоты разведённой 42 %. Оценивают, насколько ровно 4 мин инкубации с хромогенным субстратом дает оптимальное значение оптической плотности и, при необходимости, оптимизируют инкубационный период, чтобы обеспечить наилучшую зависимость. Затем измеряют оптическую плотность при 405 нм.

Определяют холостую амидолитическую активность в начале и в конце эксперимента аналогичным образом, используя трис(гидроксиметил)аминометана – натрия хлорида буферный раствор рН 7,4 (2) вместо растворов стандартного и испытуемого образцов. Холостые значения не должны отличаться между собой более чем на 0,05 абсорбционных единиц.

*Расчеты.* Проводят по аналогии с определением анти-IIа активности НФГ.

В некоторых случаях для получения линейной зависимости может потребоваться логарифмирование значений оптической плотности.

Для фармацевтических субстанций полученную активность выражают в МЕ/мг (в пересчете на сухое вещество), для лекарственных препаратов в виде растворов в МЕ/мл.

КЛОТТИНГОВЫЙ МЕТОД.

Для нефракционированных гепаринов

Метод основан на способности гепарина, за счет ингибирования ряда факторов, удлинять время свертывания нормальной плазмы.

Для проведения анализа используют нормальную человеческую плазму, стандартный образец гепарина, реагент для определения активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ-реагент) и 0,025 М раствор кальция хлорида. В качестве разбавителя стандартного и испытуемых образцов используют натрия хлорида раствор 0,9 %. Стандартный образец гепарина растворяют в воде согласно указаниям в инструкции. Готовят 3 разведения стандартного образца с активностью гепарина 0,3, 0,4 и 0,5 МЕ/мл. Полученные разведения должны удлинять время свертывания нормальной плазмы минимум в 1,5 раза, в противном случае следует использовать разведения с большей активностью гепарина. Параллельно готовят 3 разведения испытуемого образца таким образом, чтобы ориентировочно активность гепарина в данных разведениях находилась в интервале активности гепарина в разведениях стандартного образца.

Анализ проводят с помощью автоматического или полуавтоматического коагулометра в пластиковых пробирках при температуре 37 °С. В пробирку вносят 100 мкл нормальной человеческой плазмы, 100 мкл разведения стандартного или испытуемого образца или 100 мкл натрия хлорида раствора 0,9 % (холостой опыт), добавляют по 100 мкл АЧТВ-реагента и инкубируют смесь в течение 120-240 с при температуре 37±0,1 °С. Затем в пробирку вносят 100 мкл предварительно прогретого до температуры 37 °С 0,025 М раствора кальция хлорида и фиксируют время свертывания образца. Время свертывания нормальной плазмы (холостой опыт) должно составлять 25-40 с. Для каждого разведения стандартного и испытуемого образцов время свертывания определяют трижды.