**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

**Гепарин натрия ФС**

**Гепарин натрия**

**Heparinum natricum Взамен ФС 42-1327-99**

Гепарин натрия представляет собой натриевую соль глюкозаминогликана, содержащего сульфатированные и ацетилированные остатки D-глюкозамина, D-глюкуроновой кислоты и L-идуроновой кислоты. При полном гидролизе гепарина натрия образуются D-глюкозамин, D-глюкуроновая кислота, L-идуроновая кислота, уксусная кислота и серная кислота. Гепарин натрия обладает свойством удлинять время свертывания крови путем стимулирования ингибирования тромбина и фактора Xa антитромбина. Гепарин натрия получают из легких КРС или мукозы кишечника свиней. Сырье для производства поступает из хозяйств от животных, у которых отсутствуют заболевания вирусной, бактериальной, микоплазменной, прионной этиологии, патогенных для человека.

Активность должна быть не менее 180 МЕ/мг в пересчете на сухое вещество.

**Описание.** Аморфный порошок белого или почти белого цвета. \*Гигроскопичен.

**Растворимость.** Легко растворим в воде.

**Подлинность.** *1. Активность.* Должна соответствовать требованиям раздела «Количественное определение».

*2. Активность.* Проводят определение анти-Ха активности в соответствии с ОФС «Методы количественного определения гепарина» (определение анти-Ха активности НФГ). Отношение антиXa-активности к антиIIа-активности, определенной в соответствии с разделом «Количественное определение», должно быть от 0,9 до 1,1.

*3. ВЭЖХ.* Определение проводят в условиях испытания «Родственные примеси» со следующими изменениями.

Хроматографируют испытуемый раствор А и стандартный раствор В.

*Относительные времена удерживания соединений.* Гепарин – 1 (около 26 мин), дерматана сульфат и хондроитина сульфат − около 0,9 и гиперсульфатированный хондроитина сульфат− около 1,3.

*Пригодность хроматографической системы*. На хроматограмме раствора сравнения В *отношение максимум/минимум (p/v)* между высотой суммарного пика дераматана сульфата + хондроитина сульфата и высотой нижней точки линии перегиба между пиками дераматана сульфата + хондроитина сульфата и гепарина относительно базовой линии должно быть не менее 1,3.

Время удерживания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора А должно соответствовать времени удерживания основного пика на хроматограмме стандартного раствора В (раздел «Родственные примеси»).

*4. Капиллярный электрофорез (альтернативный ВЭЖХ).* Определение проводят в соответствии с ОФС «Капиллярный электрофорез».

Время миграции основного пика на электрофореграмме испытуемого раствора должно соответствовать времени миграции основного пика на электрофореграмме стандартного раствора (раздел «Родственные примеси»).

*5. Качественная реакция.* Остаток, полученный после проведения испытаний «Сульфатная зола», должен давать характерную реакцию Б на натрий.

**Удельное вращение.** Не менее +35º в пересчете на сухое вещество (4 % раствор субстанции в воде, ОФС «Поляриметрия»).

\*\***Прозрачность.** Раствор, содержащий в 1 мл 5000 МЕ субстанции, должен быть прозрачным (ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей»).

\*\***Цветность.** Раствор, приготовленный в испытании «Прозрачность» должен выдерживать сравнение с эталоном 5 подходящего цвета (ОФС «Степень окраски жидкостей»).

**рН.** От 5,5 до 8,0 (1,0 % раствор в воде, свободной от углерода диоксида, ОФС «Ионометрия», метод 3).

**Примеси нуклеотидов.** Около 40 мг (точная навеска) субстанции растворяют в 10 мл воды. Оптическая плотность полученного раствора, измеренная при 260 нм, не должна превышать 0,15.

**Белок.** Не более 0,5 % в пересчете на сухое вещество. Определение проводят методом спектрофотометрии (ОФС «[Спектрофотометрия в УФ и видимой областях](http://pharmacopoeia.ru/ofs-1-2-1-1-0003-15-spektrofotometriya-v-uf-i-vidimoj-oblastyah/)») в соответствии с ОФС «Определение белка», метод 2.

*Раствор А.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 40 мл раствора натрия гидроксида 1 % и 40 мл раствора натрия карбоната декагидрата 5 %, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

*Раствор Б.* В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 20 мл раствора меди(II) сульфата 1,25 % и 20 мл раствора натрия тартрата 2,98 %, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

*Раствор В.* Раствор Б – раствор А 1:50.

*Испытуемый раствор.* Около 0,5 г (точная навеска) субстанции помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в воде и доводят объем раствора водой до метки.

*Стандартный раствор.* Около 0,1 г (точная навеска) стандартного образца бычьего альбумина помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в воде и доводят объем раствора водой до метки. Из полученного раствора готовят разведения в воде, как указано в ОФС «Определение белка» (метод 2).

*Раствор сравнения.* Вода.

*Методика.* К 1,0 мл каждого из стандартных растворов, испытуемого раствора и раствора сравнения прибавляют 5,0 мл раствора В и оставляют на 10 мин, добавляют по 0,5 мл фосфорномолибденово-вольфрамового реактива разведенного и выдерживают при комнатной температуре 30 мин. При необходимости объемы реагентов могут быть изменены при сохранении их соотношения.

Измеряют оптическую плотность испытуемого и стандартных растворов на спектрофотометре при длине волны 750 нм.

Содержание белка в субстанции в процентах (*Х*) вычисляют по формуле:



|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *C1* | **–** | концентрация белка в испытуемом растворе, найденная по градуировочному графику мг/мл; |
|  | *a1* | **–** | навеска субстанции, мг; |
|  | *W* | **–** | потеря в массе при высушивании, %. |

**Родственные примеси.** *1. ВЭЖХ.* (ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография»).

*Подвижная фаза А (ПФА) –* 0,40 г натрия дигидрофосфата безводного помещают в мерную колбу вместимостью 1 л, растворяют в воде для хроматографии и доводят объем раствора водой до метки. Доводят значение рН полученного раствора фосфорной кислотой до 3,0.

Раствор используют свежеприготовленным.

*Подвижная фаза Б (ПФБ) –* 0,40 г натрия дигидрофосфата безводного и 140,0 г натрия перхлората помещают в мерную колбу вместимостью 1 л, растворяют в воде для хроматографии и доводят объем раствора водой до метки. Доводят значение рН полученного раствора фосфорной кислотой до 3,0.

Раствор используют свежеприготовленным.

*Испытуемый раствор А*. 50 мг субстанции растворяют в 5,0 мл воды для хроматографии.

*Испытуемый раствор Б*. Около 0,1 г (точная навеска) субстанции растворяют в 1,0 мл воды для хроматографии. К 0,5 мл полученного раствора прибавляют 0,25 мл 1 М раствор хлористоводородной кислоты, 50 мкл 25 % раствора натрия нитрита и выдерживают при комнатной температуре в течение 40 мин. Для остановки реакции к полученной смеси прибавляют 0,2 мл 1 М раствора натрия гидроксида.

*Раствор сравнения А*. 250 мг стандартного образца гепарина для физико-химического анализа растворяют воде для хроматографии и доводят объем до 2,0 мл тем же растворителем.

*Раствор сравнения Б*. К 1,2 мл раствора сравнения А прибавляют 0,3 мл стандартного образца дерматана сульфата и гиперсульфатированного хондроитина сульфата.

*Раствор сравнения В*. К 0,1 мл раствора сравнения Б прибавляют 0,9 мл воды для хроматографии.

*Раствор сравнения Г*. К 0,4 мл раствора сравнения А прибавляют 0,1 мл воды для хроматографии и перемешивают. К полученному раствору прибавляют 0,25 мл 1 М раствор хлористоводородной кислоты, 50 мкл 25 % раствора натрия нитрита и выдерживают при комнатной температуре в течение 40 мин. Для остановки реакции к полученной смеси прибавляют 0,2 мл 1 М раствора натрия гидроксида.

*Раствор сравнения Д*. К 0,5 мл раствора сравнения Б прибавляют 0,25 мл 1 М раствор хлористоводородной кислоты, 50 мкл 25 % раствора натрия нитрита и выдерживают при комнатной температуре в течение 40 мин. Для остановки реакции к полученной смеси прибавляют 0,2 мл 1 М раствора натрия гидроксида.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Предколонка | 50 мм × 2 мм, анионобменная смола, 13 мкм; |
| Колонка | 250 мм × 2 мм, анионообменная смола, 9 мкм; |
| Температура колонки | 40 °С; |
| Скорость потока | 0,22 мл/мин; |
| Детектор | спектрофотометрический, 202 нм; |
| Объем пробы | 20 мкл. |

*Режим хроматографирования*

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Время, мин | ПФА, % | ПФБ, % | Режим |
| 0–10 | 75 | 25 | Изократический |
| 10–35 | 75→0 | 25→100 | Линейный градиент |
| 35–40 | 0 | 100 | Изократический |

Колонку уравновешивают не менее 15 мин.

Хроматографируют испытуемый раствор Б, раствор сравнения Г и раствор сравнения Д.

*Относительные времена удерживания соединений.* Гепарин – 1 (около 26 мин), дерматана сульфат и хондроитина сульфат − около 0,9 и гиперсульфатированный хондроитин сульфат− около 1,3.

*Пригодность хроматографической системы*. На хроматограмме раствора сравнения Г должен отсутствовать пик со временем удерживания гепарина.

На хроматограмме раствора сравнения Д *разрешение* (*R*) между пиками дераматана сульфата + хондроитина сульфата и гиперсульфатированного хондроитина сульфата должно быть не менее 3,0.

*Допустимое содержание примесей.* На хроматограмме испытуемого раствора Б:

– площадь суммарного пика дераматана сульфата и хондроитина сульфата должна быть не более площади соответствующего пика на хроматограмме раствора сравнения Д (не более 2,0 %);

– кроме суммарного пика дераматана сульфата и хондроитина сульфата не должно быть обнаружено иных пиков.

*2. Капиллярный электрофорез (альтернативный метод).* Определение проводят в соответствии с ОФС «Капиллярный электрофорез».

*Ведущий электролит (ВЭ).* 1,0 г натрия дигидрофосфата моногидрата растворяют в 100 мл воды и доводят фосфорной кислотой значение рН раствора до 3,5. Полученный раствор переносят количественно в мерную колбу вместимостью 200 мл и доводят объем раствора водой до метки, перемешивают и фильтруют.

*Испытуемый раствор.* Около 100 мг (точная навеска) субстанции помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, растворяют в воде и доводят объем раствора водой до метки, перемешивают и фильтруют.

*Стандартный раствор.* Около 100 мг (точная навеска) стандартного образца гепарина для физико-химического анализа помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, растворяют в воде и доводят объем раствора водой до метки, перемешивают и фильтруют.

*Электрофоретические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Капилляр | плавленый кварц с полиимидным покрытием, эффективная длина около 56 см, внутренний диаметр 50 мкм; |
| Кондиционирование капилляра | Перед началом работы капилляр промывают: 1 М раствором натрия гидроксида в течение 3 мин, дважды водой по 10 мин и ВЭ 15 мин.Между анализами капилляр промывают: 1 М раствором натрия гидроксида в течение 2 мин, дважды (из разных ёмкостей) водой по 3 мин, дважды (из разных ёмкостей) ВЭ по 3 мин и выдерживают в ВЭ 10 мин без давления; |
| Температура капилляра | 30 °С; |
| Детектор | спектрофотометрический, 192 нм с шириной полосы 8 нм; |
| Ввод пробы | 10 с·50 мбар; |
| Напряжение | –20 кВ; |
| Время анализа | 20 мин. |

Последовательно вводят стандартный и испытуемый растворы.

*Пригодность электрофоретической системы*. На электрофореграмме стандартного раствора воспроизводимость времени миграции гепарина не должна отличаться более чем на ±0,1 мин. На электрофореграмме испытуемого раствора время миграции компонентов пробы должно различаться не менее чем на 0,3 мин; при различии во времени миграции менее 0,3 мин для идентификации пиков используют раствор, состоящий из испытуемого и стандартного растворов в соотношении 1:1.

На электрофореграмме испытуемого раствора должен отсутствовать остроконечный пик гиперсульфатированного хондроитина сульфата перед пиком гепарина. Допускается наличие пика дерматана сульфата после пика гепарина.

**Азот.** От 1,5 до 2,5 % в пересчете на сухое (ОФС «Определение азота в органических соединениях методом Къельдаля»). Для определения используют около 0,1 г (точная навеска) субстанции.

Сульфатная зола. От 30 % до 43 % (ОФС «Сульфатная зола»). Для определения используют около 0,5 г (точная навеска) субстанции.

Тяжёлые металлы. Не более 0,003 %. Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Тяжёлые металлы», метод 1, в зольном остатке, полученном после сжигания 1,0 г субстанции (ОФС «Сульфатная зола») с использованием 3,0 мл стандартного раствора 10 мкг/мл свинец-иона.

**Потеря в массе при высушивании.** Не более 8,0 % (ОФС «Потеря в массе при высушивании», способ 1). Около 1,0 г (точная навеска) субстанции сушат над фосфора(V) оксидом при температуре 60 ± 2 °С и остаточном давлении не более 0,67 кПа (5 мм рт. ст.) в течение 3 ч.

**Остаточные органические растворители**. В соответствии с ОФС «Остаточные органические растворители».

\*\***Бактериальные эндотоксины.** Не более 0,01 ЕЭ/МЕ гепарина (ОФС «Бактериальные эндотоксины»).

\*\***Аномальная токсичность.** Субстанция должна быть нетоксичной (ОФС «Аномальная токсичность»). Тест-доза – 100 ME гепарина в 0,5 мл раствора натрия хлорида изотонического 0,9% для инъекций на мышь, внутривенно. Срок наблюдения 24 ч.

**\*\*Стерильность.** Субстанция должна быть стерильной (ОФС «Стерильность»).

**Микробиологическая чистота.** В соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота».

**Количественное определение.** *Активность.* Проводят определение анти-IIа активности в соответствии с ОФС «Методы количественного определения гепарина» (определение анти-IIа активности НФГ).

Субстанция считается прошедшей испытание, если ее активность составляет от 90 % до 111 % от заявленной активности. Доверительный интервал установленной активности (P= 0,95) должен составлять от 80 % до 125 % от заявленной активности.

Хранение. В защищенном от света месте, при температуре не выше 30 °С.

\*Приводится для информации.

\*\*Контроль по показателям качества «Прозрачность раствора», «Цветность раствора», «Аномальная токсичность», «Бактериальные эндотоксины» и «Стерильность» проводят в субстанции, предназначенной для производства лекарственных препаратов для парентерального применения.

**Реактивы**

**Раствор натрия гидроксида 1 %.** 1,0 г натрия гидроксида растворяют в воде и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл.

**Раствор натрия карбоната декагидрата 5 %.** 5,0 г натрия карбоната декагидрата помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в воде и доводят объём раствора водой до метки.

**Раствор меди(II) сульфата 1,25 %.**1,25 г меди(II) сульфата помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в воде и доводят объём раствора водой до метки.

**Раствор натрия тартрата 2,98 %.** 2,98 г натрия тартрата помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в воде и доводят объём раствора водой до метки.

**Натрия нитрита раствор 25 %***.* Раствор 250 г/л.

Готовят непосредственно перед использованием.

**Раствор натрия хлорида изотонический 0,9%.** Около 9,0 г натрия хлорида помещают в мерную колбу вместимостью 1 л, растворяют в воде для инъекций и доводят объем раствора до метки тем же растворителем. При необходимости приготовление раствора проводят в асептических условиях.