МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |
| --- |
|  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Гепарин натрия** |  | **ФС.2.3.0007** |
| **Гепарин натрия** |  |  |
| **Heparinum natricum** |  | **Взамен ФС 42-1327-99** |

|  |
| --- |
|  |

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Мукополисахарид эфира полисерной кислоты.

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 свёртывания крови катализируя ингибирование тромбина и фактора Ха антитромбином. Гепарин натрия получают из лёгких крупного рогатого скота или мукозы кишечника свиней. Для получения исходного сырья используют животных, у которых отсутствуют опасные для человека заболевания вирусной, бактериальной, микоплазменной и прионной этиологии.

Анти-IIа активность субстанции должна составлять не менее 180 МЕ/мг (C24H31N2 Na7O35S5)n в пересчёте на сухое вещество.

СВОЙСТВА

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

\*Гигроскопичен.

**Растворимость.** Легко растворим в воде.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ

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

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

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

*4. 1H-ЯМР-спектроскопия* (ОФС «Спектроскопия ядерного магнитного резонанса»).

*Растворитель*. Дейтерия оксид, содержащий 0,02 мг/мл дейтерированного триметилсилилпропионата натрия.

Примечание – В растворитель может быть добавлен 0,012 мг/мл натрия эдетата дигидрат, если в спектре испытуемого образца или образца сравнения сигнал при 5,22 м.д. меньше 80 % от сигнала при 5,44 м.д.

Все растворы натрия эдетата дигидрата и натрия тетрадейтеродиметилсилапентаноата хранят в контейнере из полиэтилена высокой плотности.

*Испытуемый раствор*. Растворяют 20 мг субстанции в 0,7 мл растворителя.

*Раствор стандартного образца гепарина натрия.* Растворяют 20 мг фармакопейного стандартного образца гепарина натрия для ЯМР идентификации в 0,7 мл растворителя.

*Раствор для проверки пригодности системы.* Растворяют 0,15 мг стандартного образца избыточно сульфатированного хондроитин сульфата в 1,0 мл раствора сравнения.

*Оборудование.* Импульсный ЯМР-спектрометр с рабочей частотой на протонах не менее 300 МГц.

*Параметры регистрации 1H ЯМР спектров*

|  |  |
| --- | --- |
| Угол поворота импульса | от 30° до 90°; |
| Время выборки данных | не менее 2 с; |
| Время задержки между импульсными последовательностями | не менее 4 с; |
| Ширина спектра | 10–12 м.д. с центром 4,5 м.д.; |
| Количество накоплений сигнала свободной индукции | не менее 16; |
| Отношение сигнал/шум для сигнала метильной группы гепарина при 2,04 м.д. | не менее 1000:1; |
| Температура образца | 20–30 °С. |

Примечание – Спектры испытуемого раствора и раствора фармакопейного стандартного образца гепарина натрия должны записываться без вращения образца и при одинаковой температуре.

*Параметры обработки 1H ЯМР спектров*

|  |  |
| --- | --- |
| Взвешивающая функция | экспоненциальная; |
| Параметр уширения взвешивающей функции | 0,3 Гц; |
| Референсный сигнал | 0,00 м.д. (ТСП). |

*Параметры пригодности системы.* На спектре раствора для проверки пригодности хроматографической системысигналы протонов метильных групп *N*-ацетильных фрагментов гепарина и гиперсульфатированного хондроитинсульфата должны наблюдаться при 2,05±0,02 и 2,16±0,03 м.д. соответственно.

*Анализ 1H ЯМР спектров*

Спектр испытуемого раствора должен качественно соответствовать спектру раствора стандартного образца гепарина натрия после нормализации обоих спектров с целью уравнивания их по интенсивности. Допускается изменение соотношения интенсивностей некоторых сигналов в области от 3,35 до 4,55 м.д. при сохранении подобия общего вида спектров.

В спектрах должны присутствовать основные сигналы гепарина натрия (м.д.): 2,04±0,03; 3,27±0,03 (дублет); 4,34±0,03; 5,22±0,03; 5,42±0,03. Допускается появление дополнительного сигнала при 2,08±0,02 (дерматан сульфат).

В спектрах не должно наблюдаться не идентифицированных сигналов в областях от 0,10 до 2,00 м.д., от 2,10 до 3,10 м.д. и от 5,70 до 8,00 м.д. высотой более 4 % от высоты сигнала при 5,42 м.д. Допускается наличие идентифицированных сигналов протонов остаточных растворителей и других технологических примесей.

*5.* Субстанция должна соответствовать требованиям раздела «Натрий».

ИСПЫТАНИЯ

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

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

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

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

**Примеси нуклеотидов.** Оптическая плотность 0,4 % раствора субстанции в воде, измеренная в кювете с толщиной слоя 1 см при длине волны 260 нм, не должна превышать 0,15 (ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях»).

**Белок.** Не более 0,5 % (в пересчёте на сухое вещество). (ОФС «Определение белка», метод 2 (А)).

*Испытуемый раствор.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 0,5 г (точная навеска) субстанции, растворяют в воде, доводят объём раствора тем же растворителем до метки и перемешивают.

Измеряют оптическую плотность испытуемого и стандартных растворов на спектрофотометре при длине волны 750 нм в кювете с толщиной слоя 5 см.

**Родственные примеси.** Определение проводят методом ВЭЖХ (ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография»).

*Подвижная фаза А (ПФА).* В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 0,4 г натрия дигидрофосфата дигидрата, растворяют в воде, доводят значение рН фосфорной кислотой разведённой 10 % до 3,0 и доводят объём раствора водой до метки. Раствор используют свежеприготовленным.

*Подвижная фаза Б (ПФБ).* В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 0,40 г натрия дигидрофосфата дигидрата и 140 г натрия перхлората, растворяют в воде, доводят значение рН фосфорной кислотой разведённой 10 % до 3,0 и доводят объём раствора водой до метки; фильтруют и дегазируют. Раствор используют свежеприготовленным.

*Испытуемый раствор А*. В мерную колбу вместимостью 5 мл помещают 50 мг субстанции (точная навеска), растворяют в воде при помощи вихревой мешалки, доводят объём раствора водой до метки и перемешивают.

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

*Раствор стандартного образца гепарина.* Растворяют 0,25 г (точная навеска) фармакопейного стандартного образца гепарина для физико-химического анализа в 2,0 мл воды при помощи вихревой мешалки.

*Стандартный раствор А*. К 1,2 мл раствора стандартного образца гепарина для физико-химического анализа прибавляют 0,3 мл фармакопейного стандартного образца дерматана сульфата и гиперсульфатированного хондроитина сульфата (содержит 10 мг/мл дерматана сульфата и 2,5 мг/мл гиперсульфатированного хондроитина сульфата) и гомогенизируют при помощи вихревой мешалки.

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

*Стандартный раствор В*. К 0,1 мл стандартного раствора А прибавляют 0,9 мл воды и гомогенизируют при помощи вихревой мешалки.

*Контрольный раствор*. К 0,4 мл раствора стандартного образца гепарина для физико-химического анализа прибавляют 0,1 мл воды, перемешивают при помощи вихревой мешалки, далее прибавляют 0,25 мл хлористоводородной кислоты раствора 1 М, 50 мкл натрия нитрита раствора 25 % и выдерживают при комнатной температуре в течение 40 мин. Для остановки реакции к полученной смеси прибавляют 0,2 мл натрия гидроксида раствора 1 М.

*Хроматографические условия*

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

*Режим хроматографирования*

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

Колонку уравновешивают в течение не менее 15 мин.

Хроматографируют контрольный раствор, стандартный раствор Б, стандартный раствор В, испытуемый раствор А и испытуемый раствор Б.

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

*Пригодность хроматографической системы.* На хроматограмме контрольного раствора должен отсутствовать пик с относительным временем удерживания гепарина.

На хроматограмме стандартного раствора Б:

- *разрешение* *(RS)* между суммарным пиком дерматана сульфата и хондроитина сульфата и гиперсульфатированного хондроитина должно быть не менее 3,0;

- *отношение сигнал/шум (S/N)* для суммарного пика дерматана сульфата и хондроитина сульфата должно быть не менее 10,0.

На хроматограмме стандартного раствора В:

*- отношение максимум/минимум (p/v)* между суммарным пиком дерматана сульфата и хондроитина сульфата и пиком гепарина должно быть не менее 1,3;

- *относительное стандартное отклонение* площади пика гепарина должно быть не более 5,0 % (6 введений).

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

- площадь суммарного пика дерматана сульфата и хондроитина сульфата не должна превышать площадь соответствующего суммарного пика на хроматограмме стандартного раствора Б (не более 2,0 %);

- сумма площадей пиков любых других примесей не должна превышать более чем в 0,01 раз площади пиков дерматансульфата и хондроитинсульфата на хроматограмме стандартного раствора Б (не более 0,02 %);

- не учитывают пики, которые появляются во время начального изократического шага.

**Гиперсульфатированный хондроитин сульфат.** Определение проводят в условиях испытания «Подлинность. 1H-ЯМР-спектроскопия».

*Анализ 1H ЯМР спектров.* В диапазоне 1,5–3,0 м.д. не допускается присутствие характерного для гиперсульфатированного хондроитинсульфата сигнала при 2,16±0,03 м.д.

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

**Натрий.** От 9,5 до 13,5 % в пересчёте на сухое вещество. Определение проводят методом ААС (ОФС «Атомно-абсорбционная спектрометрия»).

*Раствор цезия хлорида.* В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 1,27 г цезия хлорида, растворяют в хлористоводородной кислоты растворе 0,1 М и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

*Испытуемый раствор.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 50 мг (точная навеска) субстанции, растворяют в растворе цезия хлорида и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

*Калибровочные растворы натрия.* В каждую из трёх мерных колб вместимостью 100 мл помещают по 12,5 мл, 25,0 мл и 37,5 мл раствора натрия 200 мкг/мл (ОФС «Атомно-абсорбционная спектрометрия») и доводят объём раствора раствором цезия хлорида до метки.

*Условия испытания*

|  |  |
| --- | --- |
| Источник излучения | лампа для определения натрия с полым катодом; |
| Длина волны | 330,3 нм; |
| Атомизация | воздушно-ацетиленовое пламя; |
| Расход газа | воздух –11 л/мин, ацетилен –2 л/мин. |

Определяют значения атомной абсорбции испытуемого раствора и калибровочных растворов. По калибровочной кривой рассчитывают концентрацию натрия в субстанции.

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

**Потеря в массе при высушивании.** Не более 8,0 % (ОФС «Потеря в массе при высушивании», способ 1). Сушат 1 г (точная навеска) субстанции 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.

**Тяжёлые металлы**. Не более 0,003 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Тяжёлые металлы» (метод 3Б) с использованием 3,0 мл эталонного раствора 2.

**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 натрия хлорида растворе 0,9 % для инъекций на мышь, внутривенно. Срок наблюдения – 48 ч.

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

\*\***Испытание на депрессорные вещества.** Субстанция не должна обладать депрессорным действием (ОФС «Испытание на депрессорные вещества»). Тест-доза – 5000 МЕ гепарина в 1,0 мл натрия хлорида раствора 0,9 % для инъекций на 1 кг массы животного.

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

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ

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

Результаты испытания считаются достоверными, если измеренное значение анти-IIа активности субстанции составляет не менее 90 % и не более 111 % от предполагаемой активности.

Под предполагаемой активностью подразумевают значение активности субстанции, которое используют при расчётах необходимых разбавлений растворов субстанции, используемых при выполнении испытания. В случае невыполнения данного требования необходимо провести повторное испытание со скорректированным соответствующим образом значением предполагаемой активности субстанции и её разведениями.

Доверительный интервал измеренной активности (P = 0,95) должен составлять от 80 % до 125 % от измеренной активности.

ХРАНЕНИЕ

В герметично укупоренной упаковке. Если вещество стерильно, контейнер тоже должен быть стерилен.

\*Приводится для информации.

\*\*Испытание проводят для субстанции, предназначенной для производства лекарственных препаратов для парентерального применения.