

Tỷ trọng

Từ 1,872 đến 1,877 (Phụ lục 6.5).

Khoảng chưng cất (Phụ lục 6.8)

Chế phẩm được cất hoàn toàn ở nhiệt độ từ 49,0 °C đến 51,0 °C và 95 % chế phẩm được cất trong khoảng nhiệt độ chênh lệch 1,0 °C.

Tạp chất bay hơi

Phương pháp sắc ký khí (Phụ lục 5.2).

Không được quá 0,005 %.

Sử dụng trichlorotrifluoroethan chuẩn làm chất chuẩn nội.

Dung dịch thử (1): Sử dụng chế phẩm.

Dung dịch thử (2): Pha loãng 5,0 ml trichlorotrifluoroethan chuẩn thành 100,0 ml bằng chế phẩm. Pha loãng tiếp 1,0 ml dung dịch thu được thành 100,0 ml bằng chế phẩm. Pha loãng 1,0 ml dung dịch thu được thành 10,0 ml bằng chế phẩm.

Điều kiện sắc ký:

Cột thủy tinh (2,75 m × 5 mm) được nhồi diatomit đã được silan hóa dùng cho sắc ký khí có kích thước từ 180 µm đến 250 µm; 1,8 m đầu tiên được tẩm với 30 % (kl/kl) của *macrogol 400* (TT) và phần còn lại được tẩm với 30 % (kl/kl) của *dinonyl phthalat* (TT).

Khí mang: *Nitrogen* dùng cho sắc ký khí, lưu lượng là 30 ml/min.

Detector ion hóa ngọn lửa.

Nhiệt độ cột ở 50 °C.

Thể tích tiêm: 5 µl.

Cách tiến hành:

Tiêm các dung dịch thử. Trên sắc ký đồ của dung dịch thử (2), tổng diện tích các pic, trừ pic chính và pic chuẩn nội, không được lớn hơn diện tích pic chuẩn nội, hiệu chỉnh nếu bất kỳ pic tạp nào có cùng thời gian lưu với pic chuẩn nội.

Bromid và clorid

Dung dịch S: Lấy 10 ml chế phẩm thêm vào 20 ml nước và lắc trong 3 min và lấy lớp nước.

Lấy 5 ml dung dịch S thêm vào 5 ml nước, 0,05 ml *acid nitric* (TT) và 0,2 ml *dung dịch bạc nitrat 4,25 %* (TT). Dung dịch này không được đục hơn hỗn hợp của 5 ml dung dịch S và 5 ml nước.

Brom và clor

Lấy 10 ml dung dịch S, thêm 1 ml *dung dịch kali iodid - tinh bột* (TT). Không được có màu xanh.

Thymol

Phương pháp sắc ký khí (Phụ lục 5.2).

Dung dịch chuẩn nội: Hòa tan 0,10 g *menthol* (TT) trong *methylen clorid* (TT) và pha loãng thành 100,0 ml với cùng dung môi.

Dung dịch thử: Lấy 20,0 ml chế phẩm và thêm vào 5,0 ml dung dịch chuẩn nội.

Dung dịch đối chiếu: Hòa tan 20,0 mg *thymol* (TT) trong *methylen clorid* (TT) và pha loãng thành 100,0 ml bằng cùng dung môi. Lấy 20,0 ml dung dịch thu được và thêm 5,0 ml dung dịch chuẩn nội.

Điều kiện sắc ký:

Cột mao quản silica nung chảy (15 m × 0,53 mm) được bao một lớp phim mỏng 1,5 µm *poly (dimethyl) siloxan*.

Khí mang: *Nitrogen* dùng cho sắc ký khí, lưu lượng 15 ml/min. Detector ion hóa ngọn lửa.

Nhiệt độ: Cột ở 150 °C, buồng tiêm ở 170 °C và detector ở 200 °C.

Thể tích tiêm: 1,0 µl.

Cách tiến hành:

Tiêm dung dịch chuẩn nội, dung dịch đối chiếu và dung dịch thử.

Trên sắc ký đồ của dung dịch thử, diện tích của pic thymol không được nhỏ hơn 75 % và không được lớn hơn 115 % diện tích của pic thymol trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu [0,008 % đến 0,012 % (kl/kl)].

Cẩn không bay hơi

Không được quá 0,002 %.

Làm bay hơi 50 ml chế phẩm tới khô trên cách thủy và sấy cẩn trong tủ sấy ở 100 °C đến 105 °C trong 2 h. Khối lượng cẩn còn lại không được quá 1 mg.

Bảo quản

Trong bao bì kín, tránh ánh sáng, ở nhiệt độ không quá 25 °C. Nguyên liệu làm đồ đựng phải không tương kỵ với halothan.

Loại thuốc

Thuốc mê bay hơi hít qua đường thở.

HEPARIN NATRI

Heparin natri là chế phẩm chứa muối natri của glycosaminoglycan sulfat có trong mô động vật có vú, được chiết xuất từ niêm mạc ruột của lợn. Khi thủy phân hoàn toàn, heparin giải phóng D-glucosamin, acid D-glucuronic, acid L-iduronic, acid acetic và acid sulfuric. Heparin có hoạt tính chống đông máu bằng cách làm tăng hoạt tính của antithrombin, từ đó làm mất hiệu lực của thrombin và yếu tố Xa. Chế phẩm phải có hoạt tính kháng yếu tố IIa không ít hơn 180 IU/mg, tính theo chế phẩm đã làm khô.

Sản xuất

Động vật dùng để chiết xuất heparin natri phải đảm bảo đầy đủ các yêu cầu về sức khỏe của động vật phù hợp cho con người sử dụng. Tất cả các giai đoạn của quá trình chiết xuất và nguồn nguyên liệu phải tuân theo hệ thống quản lý chất lượng phù hợp. Sử dụng phương pháp thích hợp để xác định nguồn nguyên liệu sử dụng, không được có nguyên liệu từ các loài bò, cừu, dê bị tạp nhiễm trong

quá trình sản xuất. Phương pháp xác định loài của nguồn nguyên liệu và thời điểm áp dụng kiểm tra trong quy trình sản xuất phải được thẩm định, phương pháp phải có khả năng phát hiện vật liệu tạp nhiễm từ các loài khác ở nồng độ 0,1 % (kl/kl). Các phương pháp dùng để kiểm tra loài dựa trên kỹ thuật phản ứng chuỗi polymerase (PCR) khuếch đại một đoạn phân tử DNA chọn lọc là phù hợp. Phương pháp này cũng dùng để xác định cấu trúc và hàm lượng DNA của lợn trong chế phẩm, cho phép xác định hàm lượng này có duy trì ổn định trong suốt quá trình sản xuất hay không.

Quy trình sản xuất được thiết kế nhằm giảm thiểu hoặc loại bỏ các chất gây hạ huyết áp.

Tính chất

Bột màu trắng hoặc gần như trắng, hút ẩm. Dễ tan trong nước.

Định tính

A. Chế phẩm phải đáp ứng yêu cầu của phép thử Định lượng.

B. Tiến hành định lượng hoạt tính kháng yếu tố IIa và Xa của heparin theo phần Định lượng. Tỷ số hoạt tính kháng yếu tố Xa và hoạt tính kháng yếu tố IIa phải từ 0,9 đến 1,1.

C. Phương pháp phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR)

Dung dịch A: Dung dịch *natri trimethylsilylpropionat deuteri hóa (TT)* 20 µg/ml trong *deuteri oxyd (TT)*. Nếu tín hiệu tại 5,22 ppm nhỏ hơn 80 % tín hiệu tại 5,54 ppm, dung dịch phải thêm *natri edetat (TT)* với nồng độ 12 µg/ml.

Dung dịch thử: Hòa tan 20 mg chế phẩm trong 0,7 ml dung dịch A.

Dung dịch chuẩn: Hòa tan 20 mg *heparin natri chuẩn dùng cho phép thử định tính NMR* trong 0,7 ml dung dịch A.

Bảo quản dung dịch natri edetat và dung dịch natri trimethylsilylpropionat deuteri hóa trong lọ polyethylen tỷ trọng cao.

Thiết bị: Máy quang phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) có tần số tối thiểu 300 MHz.

Phổ ¹H-NMR

Số lần quét mẫu: ít nhất 16, có thể điều chỉnh để tín hiệu heparin methyl tại 2,04 ppm cho tỷ số tín hiệu trên nhiễu (S/N) ít nhất là 1000 : 1.

Nhiệt độ: khoảng 25 °C, thực hiện quét phổ dung dịch thử và dung dịch chuẩn ở cùng nhiệt độ.

Thời gian thu tín hiệu: ít nhất 2 s.

Tổng thời gian quét (bao gồm thời gian thu tín hiệu và thời gian trì hoãn): ít nhất 4 s.

Độ rộng phổ: 10 - 12 ppm, tập trung xung quanh 4,5 ppm.

Thời gian phát xung: để tạo được 1 góc nhọn trong khoảng từ 30° đến 90°.

Quy trình

Độ rộng của dải tần số: 0,3 Hz

Sử dụng thuật toán biến đổi Fourier.

Đặt tín hiệu trimethylsilylpropionat chuẩn tại 0,00 ppm.

Yêu cầu

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân của heparin natri phải có vạch phổ tại 2,04 ppm; 3,27 ppm (đỉnh đôi); 4,34 ppm; 5,22 ppm và 5,42 ppm (sai số $\pm 0,03$ ppm).

Phổ ¹H-NMR thu được của dung dịch thử và dung dịch heparin natri chuẩn dùng để định tính NMR phải tương ứng về hình dạng và cường độ; vạch phổ methyl của tạp dermatan sulfat ở khoảng $2,08 \pm 0,02$ ppm; ở trong các khoảng 0,10 - 2,00 ppm, 2,10 - 3,10 ppm và 5,70 - 8,00 ppm, bất kỳ tín hiệu không xác định nào không được lớn hơn 4 % chiều cao của vạch phổ heparin thu được tại 5,42 ppm; những tín hiệu từ dung môi, tạp chất liên quan có thể xuất hiện trên phổ đồ nhưng cần phải định tính và trong giới hạn cho phép; trong khoảng 3,35 - 4,55 ppm có thể có sự biến đổi về cường độ của các tín hiệu thu được trong phổ heparin với kiểu tín hiệu thu được tương tự nhau nhưng cường độ khác nhau.

D. Phương pháp sắc ký lỏng (Phụ lục 5.3)

Tiến hành theo phần Tạp chất liên quan với một số thay đổi như sau:

Tiêm dung dịch thử (1) và dung dịch đối chiếu (3).

Trên sắc ký đồ thu được, thời gian lưu tương đối so với heparin (thời gian lưu khoảng 26 min): dermatan sulfat và chondroitin sulfat khoảng 0,9; over-sulfated chondroitin sulfat khoảng 1,3.

Kiểm tra tính phù hợp của hệ thống: Trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu (3), tỷ số đỉnh – hõm (H_p/H_v) ít nhất phải bằng 1,3. Trong đó H_p là chiều cao tính từ đỉnh của pic dermatan sulfat và chondroitin sulfat và H_v là chiều cao tính từ đường nền đến đáy hõm phân tách giữa pic dermatan sulfat và chondroitin sulfat với pic heparin.

Yêu cầu: Pic chính thu được trên sắc ký đồ của dung dịch thử (1) phải có thời gian lưu và hình dạng tương tự với pic chính thu được trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu (3).

E. Chế phẩm phải đáp ứng yêu cầu của phép thử Natri.

Độ trong và màu sắc của dung dịch

Hòa tan một lượng chế phẩm tương đương với 50.000 IU heparin trong nước và pha loãng thành 10 ml với cùng dung môi.

Dung dịch thu được phải trong (Phụ lục 9.2) và có màu không đậm hơn dung dịch màu đối chiếu ở mức độ 5 của dãy dung dịch màu đối chiếu nào phù hợp nhất (Phụ lục 9.3, phương pháp 2).

pH

Hòa tan 0,1 g chế phẩm trong nước không có carbon dioxyd (TT) và pha loãng thành 10 ml với cùng dung môi. pH của dung dịch thu được phải từ 5,5 đến 8,0 (Phụ lục 6.2).

Tạp nucleotid

Hòa tan 40 mg chế phẩm trong vừa đủ 10 ml nước. Độ hấp thụ (Phụ lục 4.1) của dung dịch thu được ở bước sóng 260 nm không lớn hơn 0,15.

Protein

Không được quá 0,5 %, tính theo chế phẩm đã làm khô.

Dung dịch A: Dung dịch natri hydroxyd 10 g/L - dung dịch natri carbonat 50 g/L - nước (2 : 2 : 1).

Dung dịch B: Dung dịch đồng sulfat pentahydrat 12,5 g/L - dung dịch natri tartrat 29,8 g/L - nước (2 : 2 : 1).

Dung dịch C: Dung dịch B - dung dịch A (1 : 50).

Dung dịch D: Pha loãng thuốc thử phosphomolybdotungstic (TT) với nước đến độ pha loãng phù hợp sao cho khi thêm dung dịch C và dung dịch D vào dung dịch thử/dung dịch chuẩn thì thu được dung dịch có pH khoảng $10,25 \pm 0,25$.
Dung dịch thử: Hòa tan một lượng chế phẩm trong nước thành dung dịch có nồng độ 5 mg/ml.

Dung dịch đối chiếu: Hòa tan albumin huyết thanh bò (TT) trong nước thành dung dịch có nồng độ 100 mg/ml. Pha loãng một phần dung dịch trên với nước để thu được không ít hơn 5 dung dịch chuẩn có nồng độ protein cách đều nhau nằm trong khoảng từ 5 µg/ml - 100 µg/ml.

Mẫu trắng: Nước.

Cách tiến hành: Lấy 1 ml mỗi dung dịch chuẩn, dung dịch thử và mẫu trắng vào các ống nghiệm riêng biệt, thêm 5 ml dung dịch C. Để yên trong 10 min. Thêm 0,5 ml dung dịch D, trộn đều và để yên ở nhiệt độ phòng trong 30 min. Đo độ hấp thụ (Phụ lục 4.1) của các dung dịch thu được ở bước sóng 750 nm, sử dụng dung dịch trong ống nghiệm mẫu trắng làm ống so sánh.

Tính hàm lượng protein trong chế phẩm dựa vào phương trình tuyến tính giữa nồng độ protein chuẩn với độ hấp thụ.

Tạp chất liên quan

Phương pháp sắc ký lỏng (Phụ lục 5.3), các dung dịch đối chiếu ổn định ở nhiệt độ phòng trong vòng 24 h.

Pha động A: Hòa tan 0,40 g natri dihydrophosphat (TT) trong 1000 ml nước dùng cho sắc ký (TT), điều chỉnh đến pH 3,0 bằng dung dịch acid phosphoric 10 % (TT).

Pha động B: Hòa tan 0,40 g natri dihydrophosphat (TT) trong 1000 ml nước dùng cho sắc ký (TT), thêm 140 g natri perchlorat (TT), điều chỉnh đến pH 3,0 bằng dung dịch acid phosphoric 10 % (TT). Lọc và đuổi khí.

Dung dịch thử (1): Hòa tan chính xác khoảng 50 mg chế phẩm trong 5,0 ml nước dùng cho sắc ký (TT). Lắc xoáy để hòa tan hoàn toàn.

Dung dịch thử (2): Hòa tan chính xác khoảng 0,1 g chế phẩm trong 1,0 ml nước dùng cho sắc ký (TT), lắc xoáy để hòa tan hoàn toàn. Trộn 500 µl dung dịch thu được với 250 µl dung dịch acid hydrochloric 1 M (TT), thêm 50 µl dung dịch natri nitrit (TT) 250 mg/ml. Trộn nhẹ nhàng đến khi tạo thành dung dịch đồng nhất và để yên ở nhiệt độ phòng trong 40 min, thêm 200 µl dung dịch natri hydroxyd 1 M (TT) để dừng phản ứng.

Dung dịch đối chiếu (1): Hòa tan 250 mg chuẩn heparin dùng cho phân tích hóa lý trong nước dùng cho sắc ký (TT) và pha loãng thành 2,0 ml với cùng dung môi. Lắc xoáy để hòa tan hoàn toàn.

Dung dịch đối chiếu (2): Thêm 1200 µl dung dịch đối chiếu (1) vào 300 µl chuẩn dermatan sulfat và over-sulfated chondroitin sulfat. Lắc xoáy để đồng nhất.

Dung dịch đối chiếu (3): Thêm 100 µl dung dịch đối chiếu (2) vào 900 µl nước dùng cho sắc ký (TT). Lắc xoáy để đồng nhất.

Dung dịch đối chiếu (4): Thêm 400 µl dung dịch đối chiếu (1) vào 100 µl nước dùng cho sắc ký (TT), trộn đều bằng máy lắc xoáy. Thêm 250 µl dung dịch acid hydrochloric 1 M (TT), thêm 50 µl dung dịch natri nitrit (TT) 250 mg/ml. Trộn nhẹ nhàng và để yên ở nhiệt độ phòng trong 40 min, thêm 200 µl dung dịch natri hydroxyd 1 M (TT) để dừng phản ứng.

Dung dịch đối chiếu (5): Thêm 250 µl dung dịch acid hydrochloric 1 M (TT) vào 500 µl dung dịch đối chiếu (2), thêm 50 µl dung dịch natri nitrit (TT) 250 mg/ml. Trộn nhẹ nhàng và để yên ở nhiệt độ phòng trong 40 min, thêm 200 µl dung dịch natri hydroxyd 1 M (TT) để dừng phản ứng.

Mẫu trắng: Trộn 500 µl nước dùng cho sắc ký (TT) với 250 µl dung dịch acid hydrochloric 1 M (TT), thêm 50 µl dung dịch natri nitrit (TT) 250 mg/ml. Trộn nhẹ nhàng đến khi tạo thành dung dịch đồng nhất và để yên ở nhiệt độ phòng trong 40 min, thêm 200 µl dung dịch natri hydroxyd 1 M (TT).

Điều kiện sắc ký:

Tiền cột kích thước (5 cm × 2 mm) được nhồi pha tĩnh là các hạt trao đổi anion dùng cho sắc ký (13 µm).

Cột kích thước (25 cm × 2 mm) được nhồi pha tĩnh là các hạt trao đổi anion dùng cho sắc ký (9 µm).

Nhiệt độ cột: 40 °C.

Detector quang phổ tử ngoại đặt ở bước sóng 202 nm.

Tốc độ dòng: 0,22 ml/min.

Thể tích tiêm: 20 µl.

Cách tiến hành:

Tiến hành sắc ký theo chương trình dung môi như sau:

Thời gian (min)	Pha động A (% tt/tt)	Pha động B (% tt/tt)
0 - 10	75	25
10 - 35	75 → 0	25 → 100
35 - 40	0	100
40 - 45	0 → 75	100 → 25
45 - 60	75	25

Tiến hành sắc ký với mẫu trắng, dung dịch thử (2), dung dịch đối chiếu (4) và (5).

Thời gian lưu tương đối so với heparin (thời gian lưu khoảng 26 min): dermatan sulfat và chondroitin sulfat khoảng 0,9; over-sulfated chondroitin sulfat khoảng 1,3.

Kiểm tra tính phù hợp của hệ thống: Trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu (4) không xuất hiện pic ở thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của heparin, trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu (5), độ phân giải giữa pic của dermatan sulfat và chondroitin sulfat với pic của over-sulfated chondroitin sulfat ít nhất là 3,0.

Giới hạn:

Tổng tạp dermatan sulfat và chondroitin sulfat: Không được lớn hơn tổng diện tích pic tạp dermatan sulfat và chondroitin sulfat thu được trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu (5) (2,0 %).

Tạp khác: Không được có pic nào có diện tích lớn hơn 0,01 lần tổng diện tích pic tạp dermatan sulfat và chondroitin sulfat thu được trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu (5) (tương ứng với giới hạn bỏ qua là 0,02 %). Bỏ qua những pic xuất hiện ở giai đoạn chạy đẳng dòng ban đầu và những pic xuất hiện trong mẫu trắng.

Nitrogen

Từ 1,5 % đến 2,5 %, tính theo chế phẩm đã làm khô (Phụ lục 10.9).

Dùng 0,100 g chế phẩm.

Natri

Từ 10,5 % đến 13,5 %, tính theo chế phẩm đã làm khô.

Phương pháp quang phổ hấp thụ nguyên tử (Phụ lục 4.4, phương pháp 1).

Dung dịch cesi clorid: Dung dịch chứa *cesium clorid* (TT) 1,27 mg/ml được pha trong *dung dịch acid hydrocloric* 0,1 M (TT).

Dung dịch thử: Hòa tan 50 mg chế phẩm trong dung dịch cesi clorid và pha loãng thành 100 ml với cùng dung môi.

Dây dung dịch chuẩn: Từ *dung dịch natri mẫu 200 phần triệu Na* (TT), pha loãng thành một dãy dung dịch chuẩn natri có nồng độ 25 ppm, 50 ppm, 75 ppm trong dung dịch cesi clorid.

Đo độ hấp thụ ở bước sóng 330,3 nm, dùng đèn cathod rỗng natri làm nguồn bức xạ và ngọn lửa không khí - acetylen (với tỷ lệ phù hợp, ví dụ: 11 L không khí và 2 L acetylen mỗi phút).

Mất khối lượng do làm khô

Không được quá 8,0 % (Phụ lục 9.6).

(1,000 g; 60 °C; áp suất không quá 670 Pa; phosphor pentoxyd; 3 h).

Nội độc tố vi khuẩn

Nhỏ hơn 0,01 EU/IU heparin (Phụ lục 13.2).

Nếu chế phẩm được dùng để sản xuất các dạng thuốc tiêm mà không có phương pháp hữu hiệu loại bỏ nội độc tố vi khuẩn trong quá trình sản xuất thì phải đáp ứng yêu cầu của phép thử này.

Định lượng

Hoạt tính chống đông máu của heparin được xác định trên *in vitro* dựa vào khả năng thúc đẩy quá trình bất hoạt thrombin và bất hoạt yếu tố IIa (Định lượng kháng IIa) thông qua antithrombin. Đơn vị IU của heparin là hoạt tính của một lượng heparin không phân đoạn chuẩn quốc tế. Chuẩn heparin natri tính theo đơn vị IU bằng cách so sánh với chuẩn quốc tế sử dụng 2 phương pháp định lượng sau. Định lượng hoạt tính kháng yếu tố Xa được thực hiện để xác định tỷ số giữa hoạt tính kháng yếu tố Xa với hoạt tính kháng yếu tố IIa cho phép thử Định tính B.

Định lượng hoạt tính kháng yếu tố IIa và kháng yếu tố Xa bằng phương pháp đo độ hấp thụ (phương pháp đo điểm cuối) hoặc đo sự thay đổi độ hấp thụ trong mỗi phút (phương pháp đo động học).

Dung dịch đệm tris(hydroxymethyl)aminomethan-EDTA pH 8,4: Hòa tan 10,2 g *natri clorid* (TT), 6,1 g *tris(hydroxymethyl)aminomethan* (TT), 2,8 g *natri edetat* (TT) và 1,0 g *macrogol 6000* (TT) hoặc 2,0 g *albumin huyết thanh bò* (TT)/*albumin huyết thanh người* (TT) trong 800 ml nước. Điều chỉnh đến pH 8,4 bằng *dung dịch acid hydrocloric* (TT) và thêm nước vừa đủ 1000 ml.

Dung dịch antithrombin III-1: Hoàn nguyên *antithrombin III* (TT) theo hướng dẫn của nhà sản xuất và pha loãng với *dung dịch đệm tris(hydroxymethyl)aminomethan-EDTA pH 8,4* thành dung dịch có nồng độ 0,125 IU/ml.

Dung dịch antithrombin III-2: Hoàn nguyên *antithrombin III* (TT) theo hướng dẫn của nhà sản xuất và pha loãng với *dung dịch đệm tris(hydroxymethyl)aminomethan-EDTA pH 8,4* thành dung dịch có nồng độ 1,0 IU/ml.

Dung dịch thrombin người: Hoàn nguyên *thrombin người* (TT) theo hướng dẫn của nhà sản xuất và pha loãng với *dung dịch đệm tris(hydroxymethyl)aminomethan-EDTA pH 8,4* thành dung dịch có nồng độ 5,0 IU/ml.

Dung dịch yếu tố Xa bò: Hoàn nguyên *yếu tố Xa bò* (TT) theo hướng dẫn của nhà sản xuất và pha loãng với *dung dịch đệm tris(hydroxymethyl)aminomethan-EDTA pH 8,4* thành dung dịch cho độ hấp thụ của dung dịch mẫu trắng đo ở bước sóng 405 nm phải từ 0,65 đến 1,25.

Hoạt tính kháng yếu tố IIa

Dung dịch chuẩn và dung dịch thử: Chuẩn bị 4 dãy độc lập, mỗi dãy gồm 4 độ pha loãng của dung dịch chuẩn heparin natri và dung dịch chế phẩm có nồng độ trong khoảng từ 0,005 IU/ml đến 0,03 IU/ml trong *dung dịch đệm tris(hydroxymethyl)aminomethan-EDTA pH 8,4*. Độ pha loãng lựa chọn phải cho đáp ứng tuyến tính giữa độ hấp thụ với log nồng độ.

Cách tiến hành:

Sử dụng 16 ống nghiệm cho các dung dịch thử và 16 ống nghiệm cho các dung dịch chuẩn, đánh dấu T1, T2, T3, T4 tương ứng với 4 độ pha loãng của dung dịch thử và S1, S2, S3, S4 tương ứng với 4 độ pha loãng của dung dịch chuẩn. Thêm vào mỗi ống 100 µl *dung dịch antithrombin III-1*, lắc đều. Thêm 50 µl các dung dịch chuẩn hoặc dung dịch thử, lắc đều tránh tạo bọt. Thiết kế thử nghiệm với 2 dãy liên tiếp nhau, thứ tự phản ứng các ống nghiệm ở mỗi dãy là S1, S2, S3, S4, T1, T2, T3, T4, T1, T2, T3, T4, S1, S2, S3, S4, để ổn nhiệt ở 37 °C trong ít nhất 1 min. Thêm vào mỗi ống nghiệm 25 µl *dung dịch thrombin người*. Ủ ổn nhiệt ở 37 °C chính xác trong 1 min, thêm 50 µl dung dịch cơ chất màu đặc trưng cho yếu tố IIa ở nồng độ phù hợp cho định lượng (ví dụ: *dung dịch chứa D-phenylalanyl-L-pipecolyl-L-arginin-4-nitroanilid dihydroclorid* 1,25 mM trong nước).

Phương pháp đo động học: Chuyển hỗn hợp phản ứng vào cốc đo semi-micro, xác định sự thay đổi độ hấp thụ trong vòng 1 min ở bước sóng 405 nm (Phụ lục 4.1).

Phương pháp đo điểm cuối: Sau chính xác 4 min, dừng phản ứng bằng cách thêm 50 μ l *dung dịch acid acetic 20 % (tt/tt)*. Đánh giá thời gian ủ 4 min với dung dịch cơ chất màu đã cho độ hấp thụ phù hợp chưa, có thể điều chỉnh thời gian ủ với dung dịch cơ chất màu để thu được đáp ứng tuyến tính tốt nhất giữa độ hấp thụ với log nồng độ. Sau đó chuyển hỗn hợp phản ứng vào cốc đo semi-micro rồi đo độ hấp thụ ở bước sóng 405 nm (Phụ lục 4.1).

Xác định hoạt tính phân cắt liên kết peptit của dung dịch mẫu trắng ở đầu và cuối thử nghiệm được tiến hành theo quy trình tương tự ở trên nhưng thay dung dịch chuẩn hoặc dung dịch thử bằng *dung dịch đệm tris (hydroxymethyl) aminomethan pH 8,4-EDTA*. Yêu cầu: giá trị thu được của 2 mẫu trắng khác nhau không đáng kể.

Xây dựng đường hồi quy tuyến tính giữa độ hấp thụ và log nồng độ dung dịch thử và dung dịch chuẩn heparin natri. Xác định hoạt tính kháng yếu tố IIa của chế phẩm theo đơn vị IU/ml sử dụng mô hình đường thẳng song song (Phụ lục 13.10).

Hoạt tính kháng yếu tố Xa

Dung dịch chuẩn và dung dịch thử: Chuẩn bị 4 dãy độc lập, mỗi dãy gồm 4 độ pha loãng của dung dịch chuẩn heparin natri và dung dịch chế phẩm có nồng độ trong khoảng từ 0,03 IU/ml đến 0,375 IU/ml trong *dung dịch đệm tris (hydroxymethyl) aminomethan-EDTA pH 8,4*. Độ pha loãng lựa chọn phải cho đáp ứng tuyến tính giữa độ hấp thụ với log nồng độ.

Cách tiến hành:

Sử dụng 16 ống nghiệm cho các dung dịch thử và 16 ống nghiệm cho các dung dịch chuẩn, đánh dấu T1, T2, T3, T4 tương ứng với 4 độ pha loãng của dung dịch thử và S1, S2, S3, S4 tương ứng với 4 độ pha loãng của dung dịch chuẩn. Thêm vào mỗi ống 50 μ l *dung dịch antithrombin III-2*, lắc đều. Thêm 50 μ l các dung dịch chuẩn hoặc dung dịch thử, lắc đều tránh tạo bọt. Thiết kế thử nghiệm với 2 dãy liên tiếp nhau, thứ tự phản ứng các ống nghiệm ở mỗi dãy là S1, S2, S3, S4, T1, T2, T3, T4, T1, T2, T3, T4, S1, S2, S3, S4, để ổn nhiệt ở 37 °C trong 1 min. Thêm vào mỗi ống nghiệm 100 μ l *dung dịch yếu tố Xa bò*. Ủ chính xác trong 2 min, thêm 100 μ l dung dịch cơ chất màu đặc trưng cho yếu tố Xa ở nồng độ phù hợp cho định lượng (ví dụ: dung dịch chứa *N- α -benzyloxycarbonyl-D-arginyl-L-glycyl-L-arginin-4-nitroanilid dihydroclorid 1 mM trong nước*).

Phương pháp đo động học: Chuyển hỗn hợp phản ứng vào cốc đo semi-micro, xác định sự thay đổi độ hấp thụ trong vòng 1 min ở bước sóng 405 nm (Phụ lục 4.1).

Phương pháp đo điểm cuối: Sau chính xác 4 min, thêm 50 μ l *dung dịch acid acetic bằng 20 % (tt/tt)*. Đánh giá thời gian ủ 4 min với dung dịch cơ chất màu đã cho độ hấp thụ phù hợp chưa, có thể điều chỉnh thời gian ủ với dung

dịch cơ chất màu để thu được đáp ứng tuyến tính tốt nhất giữa độ hấp thụ với log nồng độ. Sau đó chuyển hỗn hợp phản ứng vào cốc đo semi-micro rồi đo độ hấp thụ ở bước sóng 405 nm (Phụ lục 4.1).

Xác định hoạt tính phân cắt liên kết peptit của dung dịch mẫu trắng ở đầu và cuối thử nghiệm được tiến hành theo quy trình tương tự ở trên nhưng thay dung dịch chuẩn hoặc dung dịch thử bằng *dung dịch đệm tris (hydroxymethyl) aminomethan pH 8,4-EDTA*. Yêu cầu: Giá trị thu được của 2 mẫu trắng khác nhau không đáng kể.

Xây dựng đường hồi quy tuyến tính giữa độ hấp thụ và log nồng độ dung dịch thử và dung dịch chuẩn heparin natri. Xác định hoạt tính kháng yếu tố Xa của chế phẩm theo đơn vị IU/ml sử dụng mô hình đường thẳng song song (Phụ lục 13.10).

Yêu cầu: Hoạt tính kháng yếu tố IIa của heparin ước tính được phải đạt từ 90 % đến 111 % so với hoạt tính công bố. Giới hạn tin cậy của giá trị hoạt tính ước tính này (với p = 0,95) phải đạt từ 80 % đến 125 % so với hoạt tính công bố.

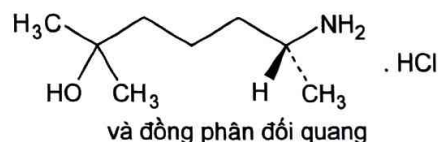
Bảo quản

Trong đồ đựng kín. Nếu chế phẩm vô khuẩn, bảo quản trong đồ đựng vô khuẩn và đảm bảo ngăn được sự xâm nhập của vi sinh vật.

Loại thuốc

Thuốc chống đông máu.

HEPTAMINOL HYDROCLORID



$C_8H_{19}NO.HCl$

P.t.l.: 181,7

Heptaminol hydroclorid là (6*RS*)-6-amino-2-methyl-heptan-2-ol hydroclorid, phải chứa từ 99,0 % đến 101,0 % $C_8H_{19}NO.HCl$, tính theo chế phẩm đã làm khô.

Tính chất

Bột kết tinh trắng hay gần như trắng.

Dễ tan trong nước, tan trong ethanol 96 %, thực tế không tan trong methylen clorid.

Định tính

Có thể chọn một trong hai nhóm định tính sau:

Nhóm I: A, D.

Nhóm II: B, C, D.

A. Phở hấp thụ hồng ngoại (Phụ lục 4.2) của chế phẩm phải phù hợp với phở hấp thụ hồng ngoại của heptaminol hydroclorid chuẩn.

B. Ở mục Tập chất liên quan, quan sát dưới ánh sáng ban ngày, dung dịch thử (2) phải cho vết chính có vị trí, màu