

MINISTERUL SĂNĂTĂȚII AL REPUBLICII MOLDOVA

CENTRUL NAȚIONAL DE TRANSFUZIE A SÎNGELUI

**COMPENDIUM**

**METODELOR DE CONTROL AL CALITĂȚII PREPARATELOR  
IMUNOBIOLOGICE DIN SÎNGE (FIZICO-CHIMICE, IMUNOCHIMICE,  
BIOLOGICE ȘI CERCETĂRILE HEMOSTAZEI)**

**CHIȘINĂU 2009**

Autori:

Centrul Național de Transfuzie a Sîngelui

Svetlana Cebotari - Director Centrul Național de Transfuzie a Sîngelui

Natalia Piscorschii – șef Laborator Control Calitate Preparate sanguine

Prezenta instrucțiune este destinată specialiștilor Serviciului de Sînge, sectorul producere și controlul calității preparatelor imunobiologice din sînge.

Recenzent: Valentin Gudumac, specialist principal al MSPS în medicina de  
laborator, profesor universitar, USMF "Nicolae Testemițanu";  
Vladimir Valica, director CȘM al USMF „N.Testemițanu”.

Compendium metodelor de control a calității preparatelor imunobiologice din sînge (fizico-chimice, imunochimice, biologice și cercetările hemostazei) este aprobat și recomandat pentru editare de Consiliul de Experti al Ministerului Sănătății  
proces verbal nr. 1 din „27” martie 2009

## CUPRINS

	Pag.
1. METODELE FIZICO-CHIMICE	
1.1. Determinarea potențiometrică Ph.	4
1.2. Determinarea pierderilor la uscare (liofilizare).	6
1.3. Determinarea glucozei cu reactiv orto-toluidinic.	7
1.4. Determinarea proteinei prin metoda bazată pe reacția biuretului.	7
1.5. Determinarea transparenței și colorației.	9
1.6. Determinarea transparenței și gradului de opalescență a lichidelor.	12
1.7. Determinarea densității relative.	17
1.8. Determinarea indicilor de refractare.	17
1.9. Determinarea rotației optice.	18
1.10. Determinarea uniformității turnării preparatelor absorbite.	18
1.11. Cromatografia.	19
1.12. Electroforeza.	23
2. METODELE IMUNOCHIMICE	
2.1. Determinarea structurii antigenice a preparatelor serice prin metoda de imuno-electroforeză.	32
2.2. Determinarea endotoxinelor bacteriene	34
2.3. Determinarea agregatelor și fragmentelor prin metoda GEL-FILTRĂRII	49
2.4. Determinarea parametrilor moleculari al polizaharidelor.	52
3. METODE DE DETERMINARE A HEMOSTAZEI	
3.1. Determinarea activității factorilor VIII și IX de coagulare a sângelui	55
4. METODELE BIOLOGICE	
4.1. Determinarea pirogenității	67
5. SURSE BIBLIOGRAFICE	69

# 1. METODELE FIZICO-CHIMICE

## 1.1 Determinarea potențimetrică a pH

pH-ul este un număr care reprezintă convențional concentrația ionilor de hidrogen într-o soluție apoasă. În scopuri practice, această definiție este una experimentală. Raportul dintre pH-ul soluției care urmează a fi examinată și cel al soluției de referință ( $pH_s$ ) este exprimat prin următoarea ecuație:

$$pH = pH_s - \frac{E - E_s}{k}$$

unde  $E$  este potențialul, exprimat în volți, a soluției care urmează a fi examinată, iar  $E_s$  - potențialul, exprimat în volți, a soluției cu pH cunoscut ( $pH_s$ ). În tabelul 1 găsiți valorile lui  $k$  la temperaturi diferite

Valorile lui  $k$  la temperaturi diferite

Tabelul 1

Temperatura °C	k
15	0,0572
20	0,0582
25	0,0592
30	0,0601
35	0,0611

Determinarea potențimetrică a pH se efectuează prin măsurarea diferenței de potențial dintre 2 electrozi imersionați în soluția care urmează a fi examinată: unul din acești electrozi este sensibil la ionii de hidrogen (de obicei un electrod de sticlă), iar altul este electrodul de referință (de exemplu, un electrod saturat din calomel).

*Dispozitivul.* Dispozitivul de măsurare este un voltmetru cu o rezistență la intrare de cel puțin 100 ori mai mare decât a electrozilor folosiți. De obicei este gradat în unități pH și are o sensibilitate, care permite atingerea unei discriminări de cel puțin 0.05 unități pH sau cel puțin 0,003 V.

*Metoda.* În absența unor indicații contrare celor prescrise în monografie, toate măsurările sunt efectuate la aceeași temperatură (20 °C - 25 °C). Tabelul 2 arată variația pH-ului în funcție de temperatură a unor soluții bufer de referință, folosite la calibrare. Dacă este necesar a corecta temperatura, urmați instrucțiunile producătorului. Dispozitivul este calibrat cu soluție bufer de ftalat de potasiu hidrogenat (standard primar) și o altă soluție bufer cu pH diferit (de preferință una arătată în Tabelul 2). pH-ul unei a treia soluții bufer cu pH intermediar nu trebuie să difere mai mult decât cu 0,05 unități pH de valoarea corespunzătoare acestei soluții. Imersionați electrozii în soluția care urmează a fi examinată și luați datele în aceleași condiții ca pentru soluțiile bufer.

*pH-ul soluțiilor bufer de referință la temperaturi diferite (variația pH per grad Celsius)*

Tabelul 2

Temperatura (°C)	Tetraoxalat de potasiu (0,05 M)	Tartrat de potasiu hidrogenat (Sat. 25 °C)	Citrat de potasiu dihidrogenat (0,05 M)	Ftalat de potasiu hidrogenat (0,05 M)	Fosfat de potasiu dihidrogenat (0,025 M) + fosfat de hidrogenat disodic (0,025 M)	Fosfat de potasiu dihidrogenat (0,0087 M) + fosfat de hidrogenat disodic (0,0303 M)	Tetraborat disodic (0,01 M)	Carbonat de sodiu (0,025M) + bicarbonat de sodiu (0,025 M)
	$C_4H_3K O_8 + 2H_2O$	$C_4H_5KO_6$	$C_6H_7KO_4$	$C_8H_5KO_6$	$KH_2PO_4 + Na_2HPO_4$	$KH_2PO_4 + Na_2HPO_4$	$Na_2B_4O$	$Na_2CO_3 + NaHCO_3$
15	1,67		3,80	4,00	6,90	7,45	9,28	10,12
20	1,68		3,79	4,00	6,88	7,43	9,23	10,06
25	1,68	3,56	3,78	4,01	6,87	7,41	9,18	10,01
30	1,68	3,55	3,77	4,02	6,85	7,40	9,14	9,97
35	1,69	3,55	3,76	4,02	6,84	7,39	9,10	9,93
	+ 0,001	- 0,0014	0,0022	+ 0,0012	- 0,0028	- 0,0028	- 0,0082	- 0,0096

Dacă dispozitivul este utilizat frecvent, regulat se vor efectua verificări. Dacă nu, asemenea verificări trebuie să fie efectuate înainte de fiecare măsurare. Toate soluțiile care urmează a fi examinate și soluțiile bufer de referință trebuie să fie preparate folosind apă R fără dioxid de carbon.

PREPARAREA SOLUȚIILOR BUFER DE REFERINȚĂ

**Tetraoxalat de potasiu 0,05 M.** Dizolvați 12,61 g de  $C_4H_3KO_8, 2H_2O$  în apă R fără dioxid de carbon, și diluați până la 1000,0 ml cu același solvent.

**Tartrat de potasiu hidrogenat saturat la 25 °C.** Agitați energic un exces de  $C_4H_5KO_6$  cu apă R fără dioxid de carbon la 25°C. Filtrați sau decantați. Preparați imediat înainte de utilizare.

**Citrat de potasiu dihidrogenat 0,05 M.** Dizolvați 11,41 g de  $C_6H_7KO_7$  în apă R fără dioxid de carbon și diluați până la 1000,0 ml cu același solvent. Preparați imediat înainte de utilizare.

**Ftalat de potasiu hidrogenat 0.05 M.** Dizolvați 10,13 g de  $C_8H_5KO_6$ , uscat la 110°C - 135°C, în apă R fără dioxid de carbon și diluați până la 1000,0 ml cu același solvent.

**Fosfat de potasiu dihidrogenat 0.025 M + fosfat de hidrogenat disodic 0.025 M.** Dizolvați 3,39 g de  $KH_2PO_4$  și 3,53 g de  $Na_2HPO_4$ , ambele uscate timp de 2 ore la 110°C - 130°C, în apă R fără dioxid de carbon și diluați până la 1000,0 ml cu același solvent.

**Fosfat de potasiu dihidrogenat 0.0087 M + fosfat de hidrogenat disodic 0,0303 M.** Dizolvați 1,18 g de  $KH_2PO_4$  și 4,30 g de  $Na_2HPO_4$ , ambele uscate timp de 2 ore la 110°C - 130°C, în apă R fără dioxid de carbon și diluați până la 1000,0 ml cu același solvent.

**Tetraborat disodic 0,01 M.** Dizolvați 3,80 g de  $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$  în apă R fără dioxid de carbon și diluați până la 1000,0 ml cu același solvent. Păstrați protejat de medii cu dioxid de carbon.

**Carbonat de sodiu 0.025 M + sodiu hidrogen carbonate 0,025 M.** Dizolvați 2,64 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> și 2,09 g de NaHCO<sub>3</sub> în apă R fără dioxid de carbon și diluați până la 1000,0 ml cu același solvent.

DEPENDENȚA DINTRE REACȚIA SOLUȚIEI, PH-UL APROXIMATIV ȘI CULOAREA UNOR INDICATORI

În absența unor indicații contrare celor prescrise în Tabelul 2, se adăugă 0,1 ml de soluție de indicator la 10 ml de soluție care urmează a fi examinată. Rezultatele sunt redată în tabelul 3.

**REAȚIA SOLUȚIEI, PH-UL APROXIMATIV ȘI CULOAREA UNOR INDICATORI**

Tabelul 3

Reactia	pH	Indicatorul	Culoarea
Alcalină	> 8	<i>Hârtie de turnesol roșie R</i>	Albastră
		<i>Soluție albastră de timol R (0.05 ml)</i>	Gri sau violet-albastră
Slab alcalină	8.0 - 10.0	<i>Soluție de fenolftaleină R (0.05 ml)</i>	Fără culoare sau roz
		<i>Soluție albastră de timol R (0.05 ml)</i>	Gri
Mult alcalină	> 10	<i>Hârtie de fenolftaleină R</i>	Roșie
		<i>Soluție albastră de timol R (0.05 ml)</i>	Violet-albastră
Neutră	6.0 - 8.0	<i>Soluție roșie de metil R</i>	Galbenă
Neutră la metil roșu	4.5-6.0	<i>Soluție roșie de metil R</i>	Oranj roșie
Neutră la fenolftaleină	< 8.0	<i>Soluție de fenolftaleină R (0.05 ml)</i>	Fără culoare: roz sau roșie după adăugarea 0,05 ml de bază 0,1 M
Acidă	< 6	<i>Soluție roșie de metil R</i>	Oranj sau rosie
		<i>Soluție albastră de bromotimol R</i>	Galbenă
Slab acidă	4.0 - 6.0	<i>Soluție roșie de metil R</i>	Oranj
		<i>Soluție verde de bromocrezol R</i>	Verde sau albastră
Mult acidă	< 4	<i>Hârtie de congo roșu R</i>	Verde sau albastră

**1.2. DETERMINAREA PIERDERILOR LA USCARE (LIOFILIZARE)**

Pierdere la uscare este pierdere de masă, exprimată în % m/m.

*Metoda.* Puneți cantitatea prescrisă de substanță care urmează a fi examinată într-un vas pentru cântărire, uscat anterior conform condițiilor prescrise pentru substanța care urmează a fi examinată. Uscați substanța până la o anumită masă sau pe durata de timp prescrisă de una din următoarele proceduri.

- "într-un desicator": uscarea este efectuată de asupra *pentoxid de difosfor R* la presiune atmosferică și la temperatura camerei;
- "în racuo": uscarea este efectuată de asupra *pentoxid de difosfor R*, la o presiune de 1.3 kPa - 2.5 kPa și la temperatura camerei;
- "în racuo în diapazonul specificat de temperatură": uscarea este efectuată de asupra *pentoxid de difosfor R*, la o presiune de 1.3 kPa - 2.5 kPa și în diapazonul de temperatură prescris în monografie;
- "într-un cuptor în diapazonul specificat de temperatură": uscarea este efectuată într-un cuptor în diapazonul de temperatură prescris în monografie;
- "în vacuum înalt": uscarea este efectuată de asupra *pentoxid de difosfor R* la o presiune ce nu depășește 0.1 kPa, la temperatura prescrisă în monografie.

Dacă sunt prescrise alte condiții, procedura care urmează a fi folosită este descrisă detaliat în monografie.

### 1.3. Determinarea glucozei cu reactivul orto-toluidinic.

Într-un balon cotat cu capacitatea de 50 ml se adaugă 1,0 ml. Preparat medicamentos (folosind pipeta calibrată după Mor) și se aduce volumul soluției cu apă purificată pînă la cota 0,5 ml. Soluția obținută se transferă într-o eprubetă, se adaugă 4,5ml reactiv orto-toluidinic. Eprubeta se acoperă cu o folie și se introduce în baia cu apa fierbinte 100°C exact numai pe 10 minute, apoi se răcește. Simultan se procedează la fel și cu 0,5 ml soluție etalon de glucoză (500mg/100ml), diluată de 10 ori cu apă purificată.

În calitate de control se iau 0,5 ml de reactiv orto-toluidinic. Se încălzește și se răcește la fel ca și soluția de analizat și soluția de etalon, dar nu mai târziu de 20 minute.

Se măsoară densitatea optică a soluțiilor, colorate în albastru-verzui, la fotoelectrocolorimetru la lungimea de undă de 630 nm în chiuvete cu grosimea stratului de 10mm.

$$Dl \times 0,5 \times 0,50 \quad Dl \times 0,5 \times 50$$

$$X = \frac{\quad}{\quad} = \quad \text{unde:}$$

$$D0 \times 10 \quad D0$$

Dl - densitatea optică soluției de analizat;

D0 - densitatea optică în soluție etalon

0,5 - concentrația glucozei în soluția etalon în %

50 - diluația soluției de analizat

10 - diluația soluției etalon

Se poate folosi un reactiv chimic pentru determinarea glucozei în sînge și alte lichide biologice. Conținutul de glucoză în preparatul medicamentos trebuie să fie de la 10 pînă la 20 gr/l.

### 1.4 DETERMINAREA PROTEINEI PRIN METODA BAZATĂ PE REACȚIA BIURETULUI

În soluție alcalină grupările peptidice ale proteinelor plasmatică complexează ionii cuprici din reactivul biuret, dînd naștere unui compus colorat. Metoda este recomandată pentru dozarea proteinelor în imunoglobuline și seruri antitoxice.

Modul de lucru

Într-un balon cotate cu capacitatea de 50 ml se introduce 1 ml de imunoglobulină, se aduce la 50 ml cu soluție 0,9% de clorură de sodiu. Se iau 5 ml din soluția obținută și se adaugă 5 ml de reactiv biuret. Concomitent se pregătește proba blank din 5 ml soluție clorură de sodiu 0,9% și 5 ml reactiv biuret. Se agită, se lasă în repaus 30 minute. Densitatea optică a probei față de blank se apreciază cu un fotocolorimetru la lungimea de undă 540 nm, folosind cuva cu drum optic de 10 mm.

Cantitatea de proteine în procente (X) se calculează cu ajutorul următoarei formule:

$$X = \frac{D_P \times C_S}{D_S}$$

$C_S$  – concentrația de proteine în soluția standard, în procente

$D_S$  - densitatea optică a soluției standard

$D_P$  - Densitatea optică a soluției de cercetat

Soluția standard se prepară din soluție standard de preparat de la uzină prin diluarea a 1 ml din aceasta cu soluție sterilă de clorură de sodiu 0,9% într-un balon cotate cu capacitatea de 50 ml. Soluția standard se conservează prin adăugarea mertiolatului până la concentrația de 100 mcg/ml. Soluția astfel preparată și păstrată la temperatura de 4-8°C poate fi întrebuințată timp de o lună. Conținutul de proteine în preparatul standard de la uzină se apreciază folosind etalonul proteic cu conținut bine determinat de proteine în preparatul de imunoglobulină.

#### Determinarea conținutului de proteine în preparatul standard de la uzină

Pentru a determina conținutul de proteine în preparatul standard de la uzină se folosesc 5 ampule cu soluție standard de imunoglobulină de la uzină și 2 ampule cu etalon de imunoglobulină.

Din fiecare ampulă se pipetează câte 1 ml soluție de probă și se diluează cu soluție sterilă de clorură de sodiu 0,9% într-un balon cotate cu capacitatea de 50 ml. Din fiecare soluție astfel obținută se iau câte 4 probe a câte 5 ml și se adaugă 5 ml de reactiv biuret. Probele se agită. Drept blank servește soluția preparată din 5 ml soluție clorură de sodiu 0,9% și 5 ml reactiv biuret. Peste 30 minute toate probele sunt supuse colorimetriei după cum este descris mai sus. Determinarea densității optice se efectuează de trei ori pentru fiecare probă, ulterior calculându-se media aritmetică a indicilor obținuți.

Devierea indicilor densității optice a probelor paralele nu trebuie să depășească  $\pm 2,5 \%$  din media aritmetică obținută. În caz că devierea indicilor densității optice a probelor paralele este mai mare de  $\pm 2,5 \%$  din media aritmetică obținută se efectuează determinarea repetată din aceleași soluții, luând câte 5 probe. Dacă devierile sunt foarte mari, analiza se efectuează din nou, folosind alte ampule cu soluție standard de imunoglobulină de la uzină și cu etalon de imunoglobulină.

Notă: La dozarea proteinelor în serurile antitoxice în calitate de soluție standard se folosește o serie de seruri, în care cantitatea de proteine a fost apreciată folosind etalonul seric al Institutului de Stat de Cercetări Științifice în domeniul standardizării și controlului preparatelor biologice în numele lui L.A.Tarasevici.

#### 1. Prepararea reactivului biuret.

Se dizolvă 90 g tartrat de sodiu și potasiu în 400 ml soluție de NaOH 0,2N, se adaugă amestecând 10 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , după dizolvare se adaugă 10 g iodură de potasiu și se aduce la 2 l cu soluție de NaOH 0,2N



## 1.5 DETERMINAREA TRANSPARENȚEI SI COLORAȚIEI.

Metoda are la bază aprecierea densității optice în domeniul vizibil la diferite lungimi de undă: pentru determinarea colorației lungimea de undă este de  $400 \pm 5$  nm (maxima de absorbție a hemoglobinei), iar pentru determinarea transparenței lungimea de undă este de  $540 \pm 10$  nm (maxima de absorbție a soluțiilor tulburi). Metoda este recomandată pentru imunoglobuline.

### Modul de lucru

Soluția se toarnă într-o cuvă cu drum optic de 3 mm, cu ajutorul fotoelectrocolorimetrului se determină densitatea optică la lungimile de undă specificate. Aprecierea densității optice a fiecărei probe se efectuează de trei ori, după care se calculează media aritmetică a indicelui.

Dacă la lungimea de undă de  $400 \pm 5$  nm densitatea optică a preparatului nu depășește 0,10, acesta se consideră incolor; dacă densitatea optică a preparatului este în limitele 0,1-0,15, se consideră că acesta are culoarea paiului.

Dacă la lungimea de undă de  $540 \pm 10$  nm densitatea optică a preparatului nu depășește 0,03, acesta se consideră transparent; dacă densitatea optică a preparatului este în limitele 0,03-0,05, se consideră că acesta este slab opalescent.

Colorația lichidelor se determină vizual prin comparație cu etaloanele respective. Pentru a fi comparate, se iau cantități egale de lichide de analizat și etaloane. Comparația se efectuează la lumină de zi, pe un fundal alb mat, turnând lichidele respective în eprubete din același fel de sticlă și cu același diametru.

Colorația probei de analizat trebuie să fie identică celei a etalonului sau foarte apropiată, dar nici într-un caz nu mai intensă, doar ceva diferită ca nuanță. Lichidul, care trebuie să fie incolor, urmează a fi privit de sus, prin întreaga coloană de lichid pe un fundal alb mat. Incolore se consideră lichidele, culoarea cărora nu diferă de cea a apei, iar în cazul soluțiilor – de cea a solventului.

### **Prepararea soluțiilor primare**

**Soluție A.** Într-un balon cotat cu capacitatea de 100 ml se dizolvă aproximativ 6,00 g clorură de cobalt omogenizată ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; M.M. 237,93) în soluție de acid sulfuric (0,1 mol/l), se amestecă și se completează la semn cu soluție de acid sulfuric (0,1 mol/l).

Conținutul de clorură de cobalt în soluție se apreciază în felul următor: într-un balon conic cu capacitatea de 250 ml și dop etanș se introduc 5 ml soluție clorură de cobalt, se adaugă 5 ml soluție peroxid de hidrogen 3% și 30 ml soluție NaOH, amestecul se fierbe timp de 10 min, apoi se răcește până la temperatura camerei, se adaugă 2 g iodură de potasiu și 15 ml soluție de acid sulfuric 50%. Iodul degajat se titrează cu soluție de tiosulfat de sodiu (0,1 mol/l) (indicator — amidon).

Concomitent se efectuează experiența martor. 1(unu) ml soluție tiosulfat de sodiu (0,1 mol/l) corespunde cu 0,02379 g clorură de cobalt (II).

Volumul soluției de clorură de cobalt ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) se diluează astfel, încât conținutul de clorură de cobalt în 1 ml să fie de 0,060 g.

**Soluție B.** Într-un balon cotate cu capacitatea de 100 ml se dizolvă 0,4900 g dicromat de potasiu omogenizat ( $K_2Cr_2O_7$ ; M.M. 294,18) în soluție de acid sulfuric (0,1 mol/l), se completează la semn cu soluție de acid sulfuric (0,1 mol/l). 1 ml de soluție obținută trebuie să conțină 0,0049 g dicromat de potasiu ( $K_2Cr_2O_7$ ).

Conținutul de dicromat de potasiu în soluție se apreciază în felul următor: într-un balon conic cu capacitatea de 250 ml și dop etanș se introduc 20 ml soluție dicromat de potasiu, se adaugă 30 ml soluție de acid clorhidric diluat și 1 g iodură de potasiu, se lasă timp de 5 min într-un loc întunecat, apoi se adaugă 80 ml apă și se titrează iodul degajat cu soluție de tiosulfat de natriu (0,1 mol/l) (indicator — amidon) până la schimbarea colorației în verde.

Concomitent se efectuează experiența martor. 1 (unu) ml soluție de tiosulfat de natriu (0,1 mol/l) corespunde cu 0,004903 g dicromat de potasiu.

**Soluție C.** Într-un balon cotate cu capacitatea de 100 ml se dizolvă aproximativ 6,00 g sulfat de cupru omogenizat (II) ( $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ; M.M. 249,68) în soluție de acid sulfuric (0,1 mol/l), se completează la semn cu soluție de acid sulfuric (0,1 mol/l).

Conținutul de sulfat de cupru în soluție se apreciază în felul următor: într-un balon conic cu capacitatea de 250 ml și dop etanș se introduc 10 ml soluție de sulfat de cupru, se adaugă 40 ml apă, 4 ml acid acetic diluat și 3 g iodură de potasiu, se amestecă și se titrează iodul degajat cu soluție de tiosulfat de natriu (0,1 mol/l) (indicator — amidon).

Concomitent se efectuează experiența martor. 1 (unu) ml soluție de tiosulfat de natriu (0,1 mol/l) corespunde cu 0,02497 g sulfat de cupru (II). Volumul soluției de sulfat de cupru ( $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ) se diluează astfel, încât conținutul de sulfat de cupru în 1 ml să fie de 0,060 g.

**Soluție D.** Într-un balon cotate cu capacitatea de 100 ml se dizolvă aproximativ 4,50 g clorură de fier (III) ( $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ ; M.M. 270,30) în soluție de acid sulfuric (0,1 mol/l), se completează la semn cu soluție de acid sulfuric (0,1 mol/l).

Conținutul de clorură de fier (III) în soluție se apreciază în felul următor: într-un balon conic cu capacitatea de 250 ml și dop etanș se introduc 10 ml soluție clorură de fier, se adaugă 15 ml soluție de acid clorhidric diluat și 4 g iodură de potasiu, se lasă timp de 15 min într-un loc întunecat, apoi se adaugă 100 ml apă și se titrează iodul degajat cu soluție de tiosulfat de natriu (0,1 mol/l) (indicator - amidon).

Concomitent se efectuează experiența martor. 1 (unu) ml soluție de tiosulfat de natriu (0,1 mol/l) corespunde cu 0,02703 g clorură de fier (III).

Volumul soluției de clorură de fier ( $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ ) se diluează astfel, încât conținutul de clorură de fier în 1 ml să fie de 0,045 g. Durata păstrării soluțiilor primare este de 1 an.

### **Prepararea soluțiilor de bază**

Soluțiile de bază se obțin prin amestecarea soluțiilor primare de clorură de cobalt (A), bicromat de potasiu (B), sulfat de cupru (C) și clorură de fier (D) cu soluție de acid sulfuric (0,1 mol/l) în proporțiile relatate în tabelul 4.

**AMESTECAREA SOLUȚIILOR PRIMARE DE CLORURĂ DE COBALT (A), DICROMAT DE POTASIU (B), SULFAT DE CUPRU (C) ȘI CLORURĂ DE FIER (D) CU SOLUȚIE DE ACID SULFURIC (0,1 MOL/L)**

Tabelul 4

Soluție de bază	Soluție A, ml	Soluție B, ml	Soluție C, ml	Soluție D, ml	Soluție acid sulfuric (0,1 mol/l), ml
I	35,00	8,00	17,00	40,00	-
II	9,50	10,70	1,90	4,00	73,90
III	40,50	6,30	6,10	12,00	35,10
IV	3,50	10,40	20,10	4,00	62,00

Durata păstrării soluțiilor de bază este de 1 an.

**Prepararea etaloanelor**

Etaloanele pentru comparație se prepară din soluțiile de bază prin diluare cu soluție de acid sulfuric (0,1 mol/l). Etaloanele (câte 5 ml) necesită de a se păstra într-un loc ferit de lumină în eprubete incolore etanșate sau în ampule sudate cu capacitatea de 5 ml.

Durata păstrării etaloanelor Nr. 1, 2, 3, 4 este de 4 zile. Etaloanele Nr 5, 6, 7 se vor folosi imediat după preparare.

**PREPARAREA ETALOANELOR**

Tabelul 5

Numărul etalonului	Etaloanele nuanțelor maro		Etaloanele nuanțelor de galben		Etaloanele nuanțelor roz		Etaloanele nuanțelor de verde	
	Scala a		Scala b		Scala c		Scala d	
	soluție de bază I, ml	soluție acid sulfuric (0,1 mol/l), ml	soluție de bază II, ml	soluție acid sulfuric (0,1 mol/l), ml	soluție de bază III, ml	soluție acid sulfuric (0,1 mol/l), ml	soluție de bază IV, ml	soluție acid sulfuric (0,1 mol/l), ml
1.	100,00	-	100,00	-	100,00	-	100,00	-
2.	50,00	50,00	50,00	50,00	50,00	50,00	50,00	50,00
3.	25,00	75,00	25,00	75,00	25,00	75,00	25,00	75,00

4.	12,50	87,50	12,50	87,50	12,50	87,50	12,5	87,50
5.	6,30	93,70	6,30	93,70	6,30	93,70	6,30	93,70
6.	3,10	96,90	3,10	96,90	3,10	96,90	3,10	96,90
7.	1,60	98,40	1,60	98,40	1,60	98,40	1,60	98,40

La compararea colorației soluției analizate cu etaloanele pe lângă numărul etalonului se mai indică și litera scalei. De exemplu, colorația soluției nu trebuie să depășească etalonul Nr. 5 b.

Notă: Pregătirea soluției de acid sulfuric (0,1 mol/l): la 1020 ml apă se adaugă încet și cu mare grijă, amestecând.

## 1.6. TRANSPARENȚA ȘI GRADUL DE OPALESCENȚĂ A LICHIDELOR

Folosind eprubete identice fără culoare, transparente, din sticlă neutră, cu o bază plată și un diametru intern de 15 mm - 25 mm, comparați lichidul care urmează a fi examinat cu o suspensie de referință proaspăt preparată după cum este descris mai jos, înălțimea stratului de lichid fiind de 40 mm. Comparați soluțiile în lumină de zi difuză peste 5 min după prepararea suspensiei de referință, privind vertical pe un fundal negru. Difuziunea luminii trebuie să fie astfel încât suspensia de referință I să poată fi clar deosebită de *apa R*, iar suspensia de referință II să poată fi clar deosebită de suspensia de referință I.

Un lichid este considerat *transparent* dacă claritatea lui este la fel ca a *apei R* sau a solventului la examinarea în condițiile descrise mai sus, sau dacă opalescența lui nu este mai pronunțată decât a suspensiei de referință I.

### REAGENȚI

**Soluție de sulfat de hidrazină.** Dizolvați 1.0 g de *sulfat de hidrazină R* în *apă R* și diluați până la 100.0 ml cu același solvent. Lăsați-o să stea 4 - 6 ore.

**Soluție de hexametilentetramină.** Dizolvați 2.5 g de *hexametilentetramină R* în 25.0 ml de *apă R* într-o colbă astupată din sticlă de 100 ml.

**Suspensie opalescentă primară.** La soluție de hexametilentetramină în colbă adăugați 25.0 ml de soluție sulfat de hidrazină. Amestecați și lăsați-o să stea timp de 24 ore. Această suspensie este stabilă timp de 2 luni, cu condiția că este păstrată într-un container de sticlă fără defecte de suprafață. Suspensia nu trebuie să adere la sticlă și trebuie să fie amestecată bine înainte de utilizare.

**Standard de opalescență.** Diluați 15.0 ml de suspensie opalescentă primară până la 1000.0 ml cu *apă R*. Această suspensie trebuie să fie proaspăt preparată și poate fi păstrată pentru cel mult 24 ore.

**Suspensiile de referință.** Preparați suspensiile de referință conform Tabelului 6. Amestecați și agitați înainte de utilizare.

### PREPARAREA SUSPENZIILOR DE REFERINȚĂ

	I	II	III	IV
Standard de opalescență	5.0ml	10.0 ml	30.0 ml	50.0 ml

Tabelul 6

<i>Apă R</i>	95.0 ml	90.0 ml	70.0 ml	50.0 ml
--------------	---------	---------	---------	---------

## GRADUL DE COLORAȚIE A LICHIDELOR

Examinarea gradului de colorație a lichidelor în spectrul maro-galben-roșu este efectuată prin una din cele 2 metode de mai jos, după cum este prescris în monografie. O soluție este fără culoare dacă are aspect de *apă R* sau de solvent sau nu este mai intens colorată decât soluția de referință M.

### Metoda I

Folosind eprubete identice fără culoare, transparente, din sticlă neutră, cu un diametru extern de 12 mm, comparați 2.0 ml de lichid care urmează a fi examinat cu 2.0 ml de *apă R* sau de solvent sau de soluție de referință (vedeți Tabelele cu soluțiile de referință) prescrisă în monografie. Comparați culorile în lumină de zi, privind vertical pe un fundal negru.

### Metoda II

Folosind eprubete identice fără culoare, transparente, din sticlă neutră, cu o bază plată și un diametru intern de 15 mm - 25 mm, comparați lichidul care urmează a fi examinat cu *apă R* sau solvent sau soluție de referință (vedeți Tabelele cu soluțiile de referință) prescrisă în monografie, înălțimea stratului de lichid fiind de 40 mm. Comparați culorile în lumină de zi difuză, privind vertical pe un fundal negru.

## REAGENȚI

### *Soluții primare*

*Soluție galbenă.* Dizolvați 46 g de *clorură de fier R* în aproximativ 900 ml de amestec din 25 ml de *acid clorhidric R* și 975 ml de *apă R* și diluați până la 1000.0 ml cu același amestec. Titrați și ajustați soluția pentru ca aceasta să conțină 45.0 mg de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  per mililitru prin adăugarea amestecului cu același acid. Feriți soluția de lumină.

*Titarea.* Într-o colbă conică de 250 ml cu dop de sticlă mată puneți 10.0 ml de soluție, 15 ml de *apă R*, 5 ml de *acid clorhidric R* și 4 g de *iodură de potasiu R*, închideți colba, lăsați-o la întuneric pentru 15 min, apoi adăugați 100 ml de *apă R*. Titrați iodul eliberat cu 0.1 M *tiosulfat de sodiu*, folosind 0.5 ml de *soluție de amidon R*, adăugată la sfârșitul titrării, drept indicator.

1 (unu) ml de 0.1M *tiosulfat de sodiu* este echivalent cu 27.03 mg of  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ .

*Soluție roșie.* Dizolvați 60 g de *clorură de cobalt R* în aproximativ 900 ml de amestec din 25 ml de *acid clorhidric R* și 975 ml de *apă R* și diluați până la 1000.0 ml cu același amestec. Titrați și ajustați soluția pentru ca aceasta să conțină 59.5 mg de  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  per mililitru prin adăugarea amestecului cu același acid.

*Titarea.* Într-o colbă conică de 250 ml cu dop de sticlă mată puneți 5.0 ml de soluție, 5 ml soluție de *peroxid de hidrogen diluat R* și 10 ml de soluție de *hidroxid de sodiu R* 300 g/l. Fierbeți atent timp de 10 min, lăsați să se răcească și adăugați 60 ml de *acid sulfuric diluat R* și 2 g de *iodură de potasiu R*. Închideți colba și dizolvați precipitatul scuturând ușor. Titrați iodul eliberat cu 0.1 M *tiosulfat de sodiu*,

folosind 0.5 ml de *soluție de amidon R*, adăugată la sfârșitul titrării, drept indicator. Punctul final este atins când soluția devine roz.

1 (unu) ml de 0.1 M *tiosulfat de sodiu* este echivalent to 23.79 mg de  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ .

*Soluție primară albastră.* Dizolvați 63 g de *sulfat de cupru R* în aproximativ 900 ml de amestec din 25 ml de *acid clorhidric R* și 975 ml de *apă R* și diluați până la 1000.0 ml cu același amestec. Titrați și ajustați soluția pentru ca aceasta să conțină 62.4 mg de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  per mililitru prin adăugarea amestecului cu același acid.

*Titrarea.* Într-o colbă conică de 250 ml cu dop de sticlă mată puneți 10.0 ml de soluție, 50 ml de apăR, 12 ml de *acid acetic diluat R* și 3 g de *iodură de potasiu R*. Titrați iodul eliberat cu 0.1 M *tiosulfat de sodiu*, folosind 0.5 ml de *soluție de amidon R*, adăugată la sfârșitul titrării, drept indicator. Punctul final este atins când soluția devine ușor pal-maronie.

1 (unu) ml de 0.1 M *tiosulfat de sodiu* este echivalent to 24.97 mg de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ .

#### *Soluțiile standard*

Folosind cele 3 soluții primare, preparați soluțiile standard după cum urmează în tabelul 7

#### *PREPARAREA SOLUȚIILE STANDARD PENTRU METODELE I ȘI II.*

Tabelul 7

Soluție standard	Volumul în mililitri			Acid clorhidric (10 g/l HCl)
	Soluție galbenă	Soluție roșie	Soluție albastră	
M (maro)	3.0	3.0	2.4	1.6
MG (maro-galbenă)	2.4	1.0	0.4	6.2
G (galbenă)	2.4	0.6	0.0	7.0
VG (verde-galbenă)	9.6	0.2	0.2	0.0
R (roșie)	1.0	2.0	0.0	7.0

Folosind cele 5 soluții standard, preparați următoarele soluții de referință.

#### *SOLUȚIILE DE REFERINȚĂ M*

Tabelul 8

Soluție de referință	Volumul în mililitri	
	Soluție standard M	Acid clorhidric (10 g/l HCl)

M <sub>1</sub>	75.0	25.0
M <sub>2</sub>	50.0	50.0
M <sub>3</sub>	37.5	62.5
M <sub>4</sub>	25.0	75.0
M <sub>5</sub>	12.5	87.5
M <sub>6</sub>	5.0	95.0
M <sub>7</sub>	2.5	97.5
M <sub>8</sub>	1.5	98.5
M <sub>9</sub>	1.0	99.0

SOLUȚIILE DE REFERINȚĂ MG

Tabelul 9

Soluție de referință	Volumul în mililitri	
	Soluție standard MG	Acid clorhidric (10 g/l HCl)
MG <sub>1</sub>	100.0	0.0
MG <sub>2</sub>	75.0	25.0
MG <sub>3</sub>	50.0	50.0
MG <sub>4</sub>	25.0	75.0
MG <sub>5</sub>	12.5	87.5
MG <sub>6</sub>	5.0	95.0
MG <sub>7</sub>	2.5	97.5

SOLUȚIILE DE REFERINȚĂ G

Tabelul 10

Soluție de referință	Volumul în mililitri	
	Soluție standard G	Acid clorhidric (10 g/l HCl)

G <sub>1</sub>	100.0	0.0
G <sub>2</sub>	75.0	25.0
G <sub>3</sub>	50.0	50.0
G <sub>4</sub>	25.0	75.0
G <sub>5</sub>	12.5	87.5
G <sub>6</sub>	5.0	95.0
G <sub>7</sub>	2.5	97.5

*SOLUȚIILE DE REFERINȚĂ VG*

Tabelul 11

Soluție de referință	Volumul în mililitri	
	Soluție standard VG	Acid clorhidric (10 g/l HCl)
VG <sub>1</sub>	25.0	75.0
VG <sub>2</sub>	15.0	85.0
VG <sub>3</sub>	8.5	91.5
VG <sub>4</sub>	5.0	95.0
VG <sub>5</sub>	3.0	97.0
VG <sub>6</sub>	1.5	98.5
VG <sub>7</sub>	0.75	99.25

*SOLUȚIILE DE REFERINȚĂ R*

Tabelul 12

Soluție de referință	Volumul în mililitri	
	Soluție standard R	Acid clorhidric (10 g/l HCl)
G <sub>1</sub>	100.0	0.0
G <sub>2</sub>	75.0	25.0
G <sub>3</sub>	50.0	50.0
G <sub>4</sub>	37.5	62.5



G <sub>5</sub>	25.0	75.0
G <sub>6</sub>	12.5	87.5
G <sub>7</sub>	5.0	95.0

## 1.7. DENSITATEA RELATIVĂ

Densitatea relativă  $d_{20}^{20}$  a unei substanțe este raportul dintre masa unui anumit volum de substanță și masa unui volum egal de apă, ambele cântărite la 20 °C.

Determinați densitatea relativă  $d_{20}^{20}$  cu precizie de zecimi, cum e prescris în monografie, folosind un picnometru, un vas pentru aprecierea densității, un cântar hidrostatic sau un hidrometru. Presiunea aerului este neglijată în timpul cântăririi; aceasta poate duce la o eroare de 1 unitate în a treia zecimală.

Frecvent sunt utilizate și alte două definiții.

Densitatea relativă  $d_{4}^{20}$  a unei substanțe este raportul dintre masa unui anumit volum de substanță la 20 °C și masa unui volum egal de apă la 4 °C.

Densitatea  $\rho_{20}$  a unei substanțe este raportul dintre masa sa și volumul său la 20 °C. Ea este exprimată în kilograme pe metru cub ( $1\text{ kg m}^{-3} = 10\text{ g cm}^{-3}$ ).

Relația numerică dintre densitatea relativă și densitatea exprimată în kilograme per metru cub este:

$$\rho_{20} = 998.202 \times d_{20}^{20} \quad \text{sau} \quad d_{20}^{20} = 1.00180 \times 10^{-3} \times \rho_{20}$$

$$\rho_{20} = 999.972 \times d_{4}^{20} \quad \text{sau} \quad d_{4}^{20} = 1.00003 \times 10^{-3} \times \rho_{20}$$

$$d_{4}^{20} = 0.998230 \times d_{20}^{20}$$

## 1.8. INDICELE DE REFRACTARE

Indicele de refractare a unui mediu, ținând cont de aer, este egal cu raportul dintre sinusul unghiului de incidență a unui fascicul de lumină în aer și sinusul unghiului de refracție a fascicului refractat într-un mediu dat.

În absența unor indicații contrare celor prescrise, indicele de refractare se măsoară la  $20 \pm 0.5$  °C, ținând cont de lungimea de undă a D-liniei sodiului ( $\lambda = 589.3$  nm); atunci simbolul va fi  $n_D^{20}$ .

Refractometrele de obicei determină unghiul critic. Într-un asemenea dispozitiv detaliul principal este o prismă cu un indice cunoscut de refractare în contact cu lichidul care urmează a fi examinat. Pentru a calibra dispozitivul, utilizați lichidele de referință enumerate în Tabelul 13. Valoarea indicelui de refractare a fiecărui lichid de referință este indicată în tabel.

### VALOAREA INDICELUI DE REFRACTARE A FIECĂRUI LICHID DE REFERINȚĂ

Tabelul 13

<b>Lichidul de referință</b>	<b><math>\Delta n / \Delta t</math></b> <b>(coeficientul de temperatură)</b>
------------------------------	---

Trimetilpentan CRS	- 0.00049
Toluen CRS	- 0.00050
Metilnaftalen CRS	- 0.00048

Pentru cazul folosirii luminii albe refractometrul este dotat cu un sistem compensator. Dispozitivul oferă date cu precizie de cel puțin a treia zecimală și dispune de posibilitatea de operare la temperatura prescrisă. Termometrul este gradat la intervale de 0.5 °C sau mai mic.

## 1.9. ROTAȚIA OPTICĂ

Rotația optică este proprietatea substanțelor de a roti planul de polarizare a luminii polarizate.

Rotația optică este considerată a fi pozitivă (+) în cazul substanțelor dextrorotatoare (adică a acelor, care rotesc planul de polarizare în direcția acelor de ceasornic și negativă (-) în cazul substanțelor laevorotatoare.

Rotația optică specifică  $[\alpha_m]_{\lambda}^t$  este rotația, exprimată în radiani (rad), măsurată la temperatura  $t$  și la lungimea de undă  $\lambda$ , dată de un lichid sau o soluție cu grosimea de 1m, care conține 1 kg/m<sup>3</sup> de substanță optic activă. Din motive practice rotația optică specifică  $[\alpha_m]_{\lambda}^t$  este de obicei exprimată în miliradiani metru patrat per kilogram (mrad·m<sup>2</sup>·kg<sup>-1</sup>).

Farmacopeea adoptă următoarele definiții convenționale.

*Unghiul rotației optice* al unui lichid pur este unghiul de rotație  $\alpha$ , exprimat în grade (°), al planului de polarizare la lungimea de undă a D-liniei sodiului ( $\lambda = 589.3$  nm), măsurat la 20°C folosind un strat de 1 dm; pentru soluți, metoda de preparare este prescrisă în monografie.

*Rotația optică specifică*  $[\alpha_m]_{\lambda}^t$  a unui lichid este unghiul de rotație  $\alpha$ , exprimat în grade (°), al planului de polarizare la lungimea de undă a D-liniei sodiului ( $\lambda = 589.3$  nm), măsurat la 20°C în substanța lichidă care urmează a fi examinată, calculată ținând cont de un strat de 1 dm; și împărțită la densitatea exprimată în gram % /metru cub.

*Rotația optică specifică*  $[\alpha_m]_{\lambda}^t$  a unei substanțe în soluție este unghiul de rotație  $\alpha$ , exprimat în grade (°), al planului de polarizare la lungimea de undă a D-liniei sodiului ( $\lambda = 589.3$  nm), măsurat la 20°C în soluția substanței care urmează a fi examinată și calculată ținând cont de un strat de 1 dm, care conține 1 kg/ml de substanță. Rotația optică specifică a unei substanțe în soluție este întotdeauna exprimată ținând cont de un solvent și o concentrație date.

În sistemul convențional, adoptat de Farmacopee, rotația optică specifică este exprimată prin valoarea sa fără unități; unitățile, grad mililitri per decimetru gram [(°)- ml ·dm<sup>-1</sup>·g<sup>-1</sup>] se subînțeleg de la sine.

Factorul de conversie din Sistemul Internațional la sistemul Farmacopeic este următorul:  $[\alpha_m]_{\lambda}^t = [\alpha]_{\lambda}^t \times 0.1745$

În anumite cazuri, specificate în monografie, unghiul de rotație poate fi măsurat la temperaturi diferite de 20°C și la alte lungimi de undă

## 1.10. DETERMINAREA UNIFORMITĂȚII TURNĂRII PREPARATELOR ADSORBITE

Metoda se bazează pe determinarea densității optice a soluțiilor opace din fiecare recipient cu calculul ulterior al coeficientului de abateri.

### Modul de lucru

Se folosesc câte 10 ampule la începutul, la mijlocul și la sfârșitul turnării. Cu ajutorul unui fotoelectrocolorimetru la lungimea de undă de 540 nm (maximumul de absorbție a soluțiilor opace) se apreciază densitatea optică a conținutului fiecărei ampule față de apă, folosind cuva cu drum optic de 1 mm.

Se calculează coeficientul de abateri pentru fiecare din cele 10 ampule. Coeficientul de abateri ( $V$ ) se calculează folosind următoarea formulă:

$$V = \frac{S \times 100}{S} \\ S = \sqrt{\frac{\sum (X - \bar{X})^2}{n-1}}$$

Unde:

- $S$  – deviația standard
- $\bar{X}$  – media aritmetică a valorii densității optice a preparatului (calculată în baza a 10 ampule)
- $X$  - densitatea optică a preparatului din fiecare ampulă - numărul de recipiente

Coeficienții de abateri la începutul, la mijlocul și la sfârșitul turnării nu trebuie să depășească 5%. Media aritmetică a valorii densității optice a preparatului la începutul, la mijlocul și la sfârșitul turnării nu trebuie să difere mai mult decât cu 5%. Drept 100% se ia media aritmetică maximală a valorii densității optice.

## **1.11. CROMATOGRAFIA LICHIDĂ**

Cromatografia lichidă este o metodă de separare cromatografică bazată pe diferența în distribuția probelor între două faze care nu se amestecă, în care faza mobilă este un lichid care percolează printr-o fază staționară aflată într-o coloană. Ea este în principal bazată pe mecanismele de adsorbție, distribuție a masei, schimbului de ioni, excludere dimensională sau interacțiune stereochemică.

### **DISPOZITIVUL**

Dispozitivul constă dintr-un sistem de pompare, un injector, o coloană cromatografică (poate fi folosită o coloană de control a temperaturii), un detector și un sistem de achiziționare a datelor (un integrator sau un registrator de cartele). Faza mobilă este alimentată din unul sau mai multe rezervoare și se strecoară prin coloană, de obicei cu o rată constantă, și apoi prin detector.

### **SISTEMELE DE POMPARE**

Sistemele de pompare a cromatografiei lichide sunt necesare pentru a repartiza faza mobilă la o rată constantă de scurgere. Fluctuațiile de presiune trebuie minimalizate, ex. prin trecerea solventului presurizat printr-un dispozitiv de amortizare a impulsurilor. Tuburile și conexiunile trebuie să fie capabile de a rezista presiunilor dezvoltate în sistemul de pompare. Pompele cromatografiei lichide pot fi dotate cu un dispozitiv de eliminare a bulelor de aer eventual intrate.

În conformitate cu programul definit, sistemele controlate de un microprocesor sunt capabile de a repartiza cu exactitate o fază mobilă alcătuită fie dintr-o compoziție constantă (eluția izocratică), fie din

una variabilă (eluția cu gradient). Pentru eluția cu gradient, sunt disponibile sisteme de pompare care repartizează solventul(ții) din câteva rezervoare, iar amestecarea solventului poate fi efectuată atât în partea de presiune joasă, cât și în cea de presiune înaltă a pompei(elor).

## INJECTOARELE

Soluția de probă este introdusă în faza mobilă la sau lângă capul coloanei, folosind un sistem de injecție care poate funcționa la presiune înaltă. Se folosesc dispozitive cu bucle fixe și volum variabil, operate manual sau printr-un prelevator de probe automat. Umplerea manuală parțială a buclilor poate conduce la o precizie mai mică a volumului de injecție.

## FAZELE STAȚIONARE

Există multe tipuri de faze staționare, folosite în cromatografia lichidelor, inclusiv:

- silice, alumină sau grafit poros, folosite în cromatografia obișnuită, în care separarea este bazată pe diferențele de adsorbție și/sau distribuție a masei,
- rezine sau polimeri cu grupuri acide sau bazice, folosite în cromatografia în bază de schimb de ioni, în care separarea este bazată pe competiția dintre ionii care urmează a fi separați și cei din faza mobilă,
- silice sau polimeri poroși, folosiți în excluderea dimensională, în care separarea este bazată pe diferența dintre volumele moleculelor, corespunzătoare excluderii sterice,
- o varietate de subzistențe modificate chimic, preparate din polimeri, silice sau grafit poros, folosite în cromatografia lichidelor în bază de inversare a fazelor, în care separarea este bazată în principal pe repartiția moleculelor între faza mobilă și faza staționară,
- faze staționare speciale, modificate chimic, ex. derivați de celuloză sau amiloză, proteine sau peptide, ciclodextrine etc., pentru separarea enantiomerilor.

Majoritatea separărilor sunt bazate pe mecanismele de partiție, utilizând silicea modificată chimic drept fază staționară și solvenți polari drept fază mobilă. Suprafața subzistenței, ex. grupurile silanice ale silicei, intră în reacție cu variați reagenți silanici cu producerea de derivați de silil cu legături covalente, care acoperă un număr variat de locusuri active de pe suprafața subzistenței. Natura fazei liante este un parametru important în determinarea proprietăților de separare ale sistemului cromatografic.

Fazele liante de obicei folosite sunt arătate mai jos:

octil	= Si-(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> - CH <sub>3</sub>	C <sub>8</sub>
octadecil	= Si-(CH <sub>2</sub> ) <sub>17</sub> - CH <sub>3</sub>	C <sub>18</sub>
fenil	= Si-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -(C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> )	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>
cianopropil	= Si-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -CN	CN
aminopropil	= Si-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -NH <sub>2</sub>	NH <sub>2</sub>
diol	= Si-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -OCH(OH)-CH <sub>2</sub> -OH	

În lipsa unor alte indicații ale producătorului, coloanele cu inversare de fază în bază de silice sunt considerate a fi stabile în fazele mobile, având un pH în diapazonul 2.0 - 8.0. Coloanele conținând grafit poros sau particule de materiale polimerice, cum ar fi stiren-divinilbenzen copolimer sunt stabile la un diapazn mai larg de pH.

În unele cazuri este aplicabilă analiza folosind cromatografia cu faze obișnuite cu silice nemodificată, grafit poros sau silice polară modificată chimic, ex. cianopropil sau diol, drept faza staționară cu o fază mobilă non-polară.

Pentru separările analitice, dimensiunea particulelor celor mai frecvent folosite faze staționare variază între 3 μm și 10 μm. Particulele pot fi sferice sau neregulate, de porozitate și arie specifică de suprafața

variate. Acești parametri contribuie la comportamentul cromatografic al unei anumite faze staționare. În caz de inversare a fazelor, natura fazei staționare, extinderea valențelor și faptul că faza staționară este sau nu acoperită (adică grupurile reziduale de silanol sunt sililate), sunt factori determinanți suplimentari. În prezența grupurilor reziduale de silanol poate avea loc sedimentarea, în special a substanțelor bazice.

Cu excepția cazurilor altfel prescrise în monografie, pentru cromatografia analitică sunt folosite coloane, confecționate din oțel inoxidabil de lungimi și diametru intern ( $\emptyset$ ) variate. Coloanele cu diametre interne mai mici de 2 mm sunt deseori numite coloanele de microcalibru. Temperatura fazei mobile și a coloanei trebuie să fie menținută la nivel constant în timpul unei analize. Majoritatea separărilor sunt efectuate la temperatura camerei, dar, pentru a obține o eficiență mai înaltă, coloanele pot fi încălzite. Se recomandă a nu încălzi coloanele mai mult de 60 °C din cauză existenței în acest caz a posibilității de degradare a fazei staționare sau modificărilor care au loc în compoziția fazei mobile.

#### FAZELE MOBILE

În cromatografia cu faze obișnuite, sunt utilizați solvenți mai puțin polari. Pentru a obține rezultate reproductibile este necesar a supraveghea cu strictețe prezența de apă în faza mobilă. În cromatografia lichidelor în bază de inversare a fazelor, sunt utilizate faze mobile apoase, cu sau fără modificatori organici.

Componentele fazei mobile sunt de obicei filtrate pentru a înlătura particulele mai mari de 0.45  $\mu\text{m}$ . Fazele mobile cu multe componente sunt preparate prin măsurarea volumelor necesare (cu excepția cazurilor când sunt specificate masele) de componente individuale, urmată de amestecare. Ca alternativă, solvenții pot fi furnizați prin pompe individuale, controlate de valve de proporționare, prin care amestecarea este efectuată respectând proporția dorită. Pentru a evita formarea bulilor de gaz în detector, solvenții de obicei sunt degazați înainte de pompare prin barbotarea cu heliu, sonicarea sau folosind membrane/ moduli vacuum, încorporate în sistem.

Solvenții pentru compoziția fazei mobile de obicei nu conțin stabilizatori și sunt transparenți la lungimea de undă de detectare, în cazul folosirii unui detector ultraviolet. Solvenții altor componente utilizate trebuie să fie de calitate corespunzătoare. Ajustarea pH, dacă este necesar, este efectuată folosind doar componentul apos al fazei mobile, și nu amestecul. Dacă sunt folosite soluții bufer, pentru a preveni cristalizarea sărurilor după completarea cromatografiei, sistemul se va clăti minuțios cu un amestec de apă și modificator organic al fazei mobile (5 %).

Fazele mobile pot conține alte componente.

#### DETECTOARELE

Cel mai frecvent utilizate detectoare sunt spectrofotometrele ultraviolet/vizibil (UV/vis), inclusiv seriile de detectoare diodice. De asemenea pot fi folosite spectrofotometrele cu fluorescență, refractometre diferențiale, detectoare electrochimice, spectrometre masice, detectoare de dispersie a luminii, detectoare de radioactivitate sau alte detectoare speciale.

#### METODA

Echilibrați coloana cu faza mobilă și rată de flux prescrise, la temperatura camerei sau la temperatura specificată în monografie, până la atingerea unei linii bazale stabile. Preparați soluția(ile) substanței care urmează a fi examinată și soluția(ile) de referință necesare. Soluțiile nu trebuie să conțină particule solide.

Criteriile de evaluare a corespunderii sistemului sunt descrise în capitolul despre *Tehnicile de separare cromatografică*. Extinderile ajustărilor parametrilor sistemului cromatografic, care pot fi efectuate pentru a satisface criteriile de corespundere a sistemului, sunt de asemenea date în acest capitol.

## - CROMATOGRAFIA ÎN BAZĂ DE EXCLUDERE DIMENSIONALĂ

Cromatografia în bază de excludere dimensională este o tehnică cromatografică, care separă moleculele din soluție în funcție de dimensiunea lor. Dacă fazele mobile sunt organice, tehnica este numită cromatografia de permeație în gel, iar dacă fazele mobile sunt apoase, se folosește termenul cromatografia de filtrație în gel. Proba este introdusă într-o coloană, umplută cu gel sau cu material cu particule poroase, și este trecută prin coloană de către faza mobilă. Separarea dimensională se produce prin schimbul repetat de molecule dizolvate între solventul fazei mobile și același solvent în lichidul fazei stagnante (faza staționară) în porii materialului de umplere. Diapazonul dimensiunilor moleculare, în care poate avea loc separarea, este determinat de diapazonul dimensiunilor porilor materialului de umplere.

Moleculele suficient de mici pentru a penetra toate spațiile poroase eluează formând volumul total de permeație ( $V$ ). Pe de altă parte, moleculele mai mari de dimensiunea maximă a porilor materialului de umplere migrează de-a lungul coloanei doar prin spațiile dintre particulele materialului de umplere, fără a fi reținute, și eluează formând volumul de excludere ( $V_n$  volumul de eliminare). Între volumul de excludere și volumul total de permeație se produce separarea în funcție de dimensiunea moleculară, separarea utilă aflându-se de obicei în primele două treimi ale acestui diapazon.

*Dispozitivul.* Dispozitivul constă în principal dintr-o coloană cromatografică de lungime și diametru intern ( $\emptyset$ ) variate, la necesitate cu control de temperatură, umplută cu un material de separare, capabil de a fracționa dimensiunile moleculare ale unui diapazon corespunzător și prin care eluentul trece la o rată constantă. Un capăt al coloanei este de obicei prins la un dispozitiv potrivit pentru aplicarea probei cum ar fi un adaptor de flux, o seringă, conectată printr-un sept sau o valvă de injecție; de asemenea poate fi conectat la o pompă adecvată pentru supravegherea fluxului de eluent. În mod alternativ proba poate fi aplicată direct pe suprafața patului drenat sau, dacă proba este mai densă decât eluentul, ea poate fi plasată dedesubtul eluentului. Îieșirea din coloană este de obicei conectată la un detector corespunzător, dotat cu un sistem de înregistrare automată, care permite monitorizarea concentrațiilor relative ale componentelor separate ale probei. Detectorii de obicei funcționează în baza proprietăților fotometrice, refractometrice sau luminescente. Dacă este necesar poate fi atașat un colector automat al fracțiilor.

Materialul de umplere poate fi un suport moale, cum ar fi un gel umflat, sau un suport rigid, compus dintr-un material cum ar fi sticla, silicea sau un polimer organic compatibil cu solventul, cu legături încrucișate. Suporturile rigide de obicei necesită sisteme presurizate, în care separarea se produce mai rapid. Faza mobilă este selectată în conformitate cu tipul probei, mediul de separare și metoda de detectare. Înainte de a efectua separarea, materialul de umplere este tratat, iar coloana este umplută după cum este descris în monografie sau în conformitate cu instrucțiunile producătorului.

Criteriile de evaluare a corespunderii sistemului sunt descrise în capitolul despre *Tehnicile de separare cromatografică*. Extinderile ajustărilor parametrilor sistemului cromatografic, care pot fi efectuate pentru a satisface criteriile de corespundere a sistemului, sunt de asemenea date în acest capitol.

### DETERMINAREA COMPOZIȚIEI COMPONENTELOR RELATIVE ALE AMESTECURILOR.

Efectuați separarea după cum este indicat în monografie. Dacă este posibil, monitorizați continuu eluția componentelor și măsurați ariile de vârf corespunzătoare. Dacă proba este monitorizată luând în considerație o proprietate fizico-chimică, la care toate componentele de interes manifestă răspunsuri echivalente (de exemplu dacă ele au aceeași absorbantă specifică), calculați cantitatea relativă a fiecărui component prin împărțirea ariei de vârf respective la suma ariilor de vârf a tuturor componentelor de interes. Dacă răspunsurile la proprietatea folosită în detectarea componentelor de interes nu sunt

echivalente, calculați conținutul prin intermediul curbelor de calibrare, obținute prin standardele de calibrare prescrise în monografie.

#### DETERMINAREA MASELOR MOLECULARE

Cromatografia în bază de excludere dimensională poate fi folosită la determinarea maselor moleculare prin compararea cu standardele corespunzătoare de calibrare, specificate în monografie. Volumele de retenție ale standardelor de calibrare pot fi reprezentate grafic vizavi de Iogarithmii maselor lor moleculare. Graficul de obicei reprezintă o linie aproximativ dreaptă în limitele de excludere și de permeație totală ale mediului de separare folosit. Folosind curbele de calibrare, se pot estima masele moleculare. Calibrarea masei moleculare este valabilă doar pentru un sistem anume de substanță macromoleculară dizolvată/solvent, folosit în condițiile experimentale specificate.

#### DETERMINAREA DISTRIBUȚIEI DIMENSIUNILOR MOLECULARE ALE POLIMERILOR

Cromatografia în bază de excludere dimensională poate fi folosită la determinarea distribuției dimensiunilor moleculare ale polimerilor. Totuși, compararea probelor poate fi valabilă doar pentru rezultatele obținute în aceleași condiții experimentale. Substanțele de referință folosite pentru calibrare și metodele de determinare a distribuției dimensiunilor moleculare ale polimerilor sunt specificate în monografie.

### 1.12. ELECTROFOREZA

#### PRINCIPIUL GENERAL

Sub influența unui câmp electric, particulele încărcate, dizolvate sau dispersate într-o soluție de electrolit, migrează în direcția electrodului de polaritate opusă. La electroforeza în gel, deplasarea particulelor este încetinită de interacțiunile cu matricea de gel, care acționează ca o sită moleculară. Interacțiunile opuse ale forței electrice și sitei moleculare rezultă în diferențierea ratelor de migrare în funcție de dimensiunile, formele și încărcătura particulelor. Datorită proprietăților lor fizico-chimice diferite, diferite macromolecule ale unui amestec vor migra cu viteză diferită în timpul electroforezei și astfel se vor separa în fracții aparte. Separările electroforetice pot fi efectuate în sisteme fără faze de suport (ex. separarea liberă a soluției în electroforeza capilară) și în medii stabilizatoare cum ar fi plăci subțiri stratificate, filme sau geluri.

#### ELECTROFOREZA CU LIMITE LIBERE SAU MIGRATOARE

Această metoda este în special folosită pentru determinarea mobilității, caracteristicile experimentale putând fi măsurate și reproduse direct. Este în special utilizată cu substanțe cu masă moleculară relativă mare și difuzibilitate mică. Limitele sunt inițial apreciate printr-un proces fizic cum ar fi refractometria sau conductimetria. După aplicarea unui câmp electric dat pentru un timp exact determinat, sunt notate noile limite și pozițiile respective lor. Condițiile de operare trebuie să fie astfel, încât să ofere posibilitatea de a determina atâtea limite, câte componente există.

#### ELECTROFOREZA ZONALĂ FOLOSIND UN MEDIU DE SUPORT

Această metoda necesită utilizarea doar a probelor mici.

Natura suportului, cum ar fi hârtie, gel de agar, acetat de celuloză, amidon, agaroză, metacrilamidă, gel amestecat, introduce o serie de factori suplimentari, care modifică mobilitatea:

a) datorită rețelei de canale din mediul de suport, distanța aparent parcursă este mai mică de distanța reală,  
b) unele medii de suport nu sunt neutre din punct de vedere electric. Deoarece mediul reprezintă faza staționară el poate uneori da naștere unui flux electro-osmotic considerabil.

c) orice încălzire, datorată efectului joule, poate cauza evaporarea unei părți din lichidul mediului de suport care, prin capilaritate, provoacă deplasarea soluției de la capete spre centru. Din acest motiv puterea ionică tinde a crește treptat.

Rata de migrare depinde de patru factori majori: mobilitatea particulelelor încărcate, fluxul electro-endosmotic, fluxul de evaporare, și puterea câmpului. Prin urmare, este necesar a opera în condiții experimentale clar definite și, oriunde este posibil, a utiliza substanțe de referință.

Un *dispozitiv* pentru electroforeză constă din:

- un *generator direct de curent*, voltajul căruia poate fi controlat și, de preferință, stabilizat.
- o cameră pentru electroforeză. Aceasta este de obicei rectangulară, confecționată din sticlă sau plastic rigid, cu două compartimente separate, cel anodic și cel catodic, care conțin soluția de electrolit. În fiecare compartiment este imersat un electrod, de exemplu de platină sau grafit. Aceștia sunt conectați prin intermediul unui circuit adecvat izolat la terminalul corespunzător al sursei de alimentare cu curent, pentru a forma anodul și catodul. Pentru a preveni sifonarea, lichidul din cele două compartimente este menținut la un nivel egal. Camera pentru electroforeză este dotată cu un capac, care nu permite pătrunderea aerului și menține o atmosferă saturată cu umezeală în timpul operării, reducând evaporarea solventului. Pentru deconectarea curentului la înlăturarea capacului poate fi folosit un dispozitiv de siguranță. Dacă puterea electrică, măsurată de-a lungul bandelei, depășește 10 W, este de dorit a răci suportul.
- un dispozitiv de portaj al suportului:

*Electroforeza pe bandeletă.* Bandelela de suport, umezită anterior cu aceeași soluție conductoare și cufundată la fiecare capăt într-un compartiment pentru electrozi, este întinsă potrivit și fixată de un purtător corespunzător, menit pentru a preveni difuziunea electrolitului conductiv, cum ar fi o ramă orizontală, un stand sub formă de V inversat sau o suprafață uniformă cu puncte de contact la intervale potrivite.

*Electroforeza în gel.* Dispozitivul constă în principal dintr-o placă de sticlă (de exemplu, o sticlă pentru microscop), pe întreaga suprafață a căreia este depus un strat bine aderent de gel cu grosime uniformă. Conexiunea dintre gel și soluția conductivă este realizată în moduri diferite, în funcție de tipul dispozitivului folosit. Se vor lua precauțiuni pentru a evita condensarea umezelii sau uscarea stratului solid.

- *dispozitivul de măsurare sau modurile de detectare.*

*Metoda.* Introduceți soluție de electrolit în compartimentele pentru electrozi. Puneți suportul, corespunzător impregnat cu soluție de electrolit, în cameră în condițiile prescrise pentru tipul dispozitivului folosit. Fixați linia de start și aplicați proba. Aplicați curent electric pentru durata prescrisă de timp. După deconectarea curentului, înlăturați suportul din cameră, uscați și examinați-l vizual.

## ELECTROFOREZA ÎN BAGHETE DE GEL POLIACRILAMIDIC

În electroforeza în baghete de gel poliacrilamidic, faza staționară este un gel preparat dintr-un amestec de acrilamid și N.N'-metilenebisacrilamid. Baghetele de gel sunt preparate în tuburi cu lungimea de 7.5 cm și un diametru intern de 0.5 cm, fiecărei baghete aplicându-i-se o soluție.

*Dispozitivul.* Acesta constă din două rezervoare cu soluții bufer din material corespunzător, cum ar fi polimetil metacrilat, și montate vertical unul deasupra celuilalt. Fiecare rezervor este dotat cu un electrod de platină. Electrozii sunt conectați la o sursă de alimentare cu curent, care permite operarea fie cu curent continuu, fie la voltaj constant. La baza rezervorului superior dispozitivul dispune de o serie de susținătoare echidistante de la electrod.

*Metoda.* Soluțiile de obicei trebuie degazate înainte de polimerizare și gelurile folosite imediat după preparare. Preparați amestecul de gel după cum este prescris și turnați-l în eprubete potrivite de sticlă, astupate la fund, la o înălțime egală în fiecare eprubetă și la aproximativ 1 cm de la margine, având



grijă ca nici o bulă de aer să nu fie prezentă în eprubete. Acoperiți amestecul de gel cu un strat de apă R pentru a exclude aerul și a-i permite să se așeze. Formarea de gel de obicei durează aproximativ 30 min și ia sfârșit la apariția unei interfețe între gel și stratul de apă. Înlăturați stratul de apă. Umpleți rezervorul inferior cu soluția bufer prescrisă și înlăturați dopurile din eprubete. Puneți eprubetele în susținătoarele rezervorului superior și ajustați astfel, încât fundul eprubetelor să fie imersionat în soluția bufer din rezervorul inferior. Umpleți atent eprubetele cu soluția bufer prescrisă. Preparați soluțiile test și de referință, conținând indicatorii prescriși și faceți-le mai dense prin dizolvarea în ele, de exemplu, a *sucrozei R*. Aplicați soluțiile pe suprafața unui gel, folosind o eprubetă diferită pentru fiecare soluție. Adăugați același bufer în rezervorul superior. Conectați electrozii la sursa de alimentare cu curent și lăsați să se petreacă electroforeza la temperatura prescrisă, folosind voltajul sau curentul constant prescris. Deconectați sursa de alimentare cu curent atunci când indicatorii aproape că au migrat în rezervorul inferior. Imediat înlăturați eprubetele din dispozitiv și scoateți gelul. Fixați poziția benzilor de pe electroforegramă după cum este prescris.

## ELECTROFOREZA ÎN GEL POLIACRILAMIDIC CU DODECIL SULFAT DE SODIU (SUS-PAGE)

**Scopul.** Electroforeza în gel poliacrilamidic este folosită pentru caracterizarea calitativă a proteinelor din compozițiile biologice, pentru controlul purității și determinări cantitative.

**Utilizarea.** Electroforeza analitică în gel este o metodă adecvată pentru identificarea și aprecierea omogenității proteinelor în preparatele farmaceutice. Metoda este folosită de rutină pentru estimarea maselor moleculare a subunităților proteice și pentru determinarea compozițiilor subunităților proteinelor purificate.

Gelurile și reagenții gata pentru utilizare sunt larg disponibili pe piață și pot fi folosiți în loc de cei descriși în acest text, cu condiția că cu ei se pot obține rezultatele echivalente și că ei corespund cerințelor de valabilitate enumerate mai jos în *Validarea testului*.

## CARACTERISTICILE GELURILOR POLIACRILAMIDICE

Proprietățile de sită a gelurilor poliacrilamidice sunt date de o rețea tridimensională de fibre și pori, care este formată de legăturile încrucișate bifuncționale ale bisacrilamidei, adiacente lanțului poliacrilamidic. Polimerizarea este catalizată de un sistem de generare a radicalilor liberi, alcătuit din persulfat de amoniu și tetrametiletildiamină.

Odată cu creșterea concentrației de acrilamid în gel, dimensiunea efectivă a porilor săi descrește. Dimensiunea efectivă a porilor unui gel este definită operațional de proprietățile sale de sită, adică de rezistența, pe care o opune migrării macromoleculilor. Există limite ale concentrațiilor de acrilamid care pot fi folosite. La concentrații mari de acrilamid, gelurile crapă mult mai ușor și sunt greu de mănuit. Odată cu micșorarea dimensiunilor porilor descrește și rata de migrare a unei proteine prin gel. Prin ajustarea dimensiunilor porilor unui gel, adică prin modificarea concentrației de acrilamid, rezoluția metodei poate fi optimizată pentru un produs proteic dat. Astfel, un gel este caracterizat fizic de compoziția respectivă de acrilamid și bisacrlamid.

În afară de compoziția gelului, un component important pentru mobilitatea electroforetică este starea proteinei. În cazul proteinelor, mobilitatea electroforetică depinde de valoarea pK a grupurilor încărcate și de dimensiunea moleculelor. Ea este influențată de tipul, concentrația și pH-ul buferului, de temperatură și intensitatea câmpului, precum și de natura materialului de suport.

## ELECTROFOREZA ÎN GEL PRIN DENATURAREA POLIACRILAMIDEI

Metoda citată drept un exemplu este limitată la analiza polipeptidelor monomerice cu un diapazon de masă cuprins între 14 000 și 100 000 daltoni. Prin intermediul a variate tehnici este posibil a extinde acest diapazon de masă (ex. geluri cu gradient, sistem de bufer particulare), însă aceste tehnici nu sunt puse în discuție în acest capitol.

Electroforeza în gel prin denaturarea poliacrilamidei cu folosirea sulfat dodecil de sodiu (SDS-PAGE) este cel mai obișnuit mod de electroforeză, folosit în evaluarea calității farmaceutice a produselor proteice și asupra ei se va focusa metoda dată drept exemplu. De obicei, electroforeza analitică a proteinelor este efectuată în geluri poli(acrilamidice în condiții, care asigură disociația proteinelor în subunitățile lor individuale polipeptide și care minimalizează agregarea. Cel mai frecvent utilizat este detergentul anionic puternic sulfat dodecil de sodiu (SDS), care în combinație cu căldura, scindează proteinele înainte ca acestea să se depună pe gel. Polipeptidele denaturate se leagă cu SDS, devin încărcate negativ și prezintă un raport consistent încărcătură – masă, în funcție de tipul proteinei. Deoarece cantitatea de SDS legat este aproape întotdeauna proporțională cu masa moleculară a polipeptidei și este independentă de succesiunea ei, complexe SDS-polipeptidă migrează prin gelurile poli(acrilamidice cu mobilități dependente de dimensiunile polipeptidei.

Mobilitățile electroforetice ale complexelor rezultante de detergent-polipeptid prezintă și ele aceeași dependență funcțională de masele lor moleculare. Migrarea complexelor SDS este predictibilă spre anod, complexe cu masă moleculară mică migrând mai repede decât cele cu masă moleculară mai mare. De aceea masa moleculară a unei proteine poate fi estimată știindu-i mobilitatea relativă în SDS-PAGE calibrat, apariția unei singure benzi într-un asemenea gel fiind un criteriu de puritate.

Totuși, modificările în structura polipeptidelor, cum ar fi glicozilarea legăturilor N- sau O-, au un impact semnificativ asupra masei moleculare a proteinei, din vreme ce SDS nu se leagă de partea carbohidrată într-un mod similar polipeptidei. Astfel, raportul consistent încărcătură – masă nu este menținut. Masa moleculară a proteinelor care au suportat modificări post-tranlaționale nu reflectă masa reală a lanțului polipeptidic.

**Condițiile de Reducere.** Subunitățile polipeptidice și structura tridimensională este deseori menținută în proteine de prezența legăturilor disulfide. Scopul analizei SDS-PAGE în condiții de reducere este de a rupe această structură prin reducerea legăturilor disulfide. Denaturarea și disociația completă a proteinelor prin tratament cu 2-mercaptoetanol sau ditiotreit (DTT) va rezulta în desfășurarea structurii polipeptidei și formarea ulterioară de complexe cu SDS. În aceste condiții, masa moleculară a subunităților polipeptidice poate fi calculată prin regresia liniară în prezența unor standarde corespunzătoare de masă moleculară.

**Condițiile de non-reducere.** Pentru unele analize, disociația completă a proteinelor în subunități peptidice nu este de dorit. În absența tratamentului cu agenți de reducere, cum ar fi 2-mercaptoetanol sau DTT, legăturile disulfide bivalente rămân intacte, păstrând forma oligomerică a proteinei. Complexele oligomerice SDS-proteină migrează mai lent decât subunitățile lor SDS-polipeptidă. În plus, proteinele nereduse pot să nu fie complet saturate cu SDS și, prin urmare, pot să nu lege detergentul la un raport constant cu masa. Aceasta face determinarea masei moleculare a acestor molecule prin SDS-PAGE mai puțin sigură decât analiza polipeptidelor deplin denaturate, din vreme ce pentru a face comparații valabile este necesar ca atât standardele, cât și proteinele necunoscute să se afle în configurații similare. Totuși, apariția unei singure benzi într-un asemenea gel este un criteriu de puritate.

## CARACTERISTICILE ELECTROFOREZEI ÎN GEL DINTR-UN SISTEM DE BUFER ÎNTRERUPT

Cea mai populară metodă electroforetică de apreciere a amestecurilor din complexe de proteine implică utilizarea unui sistem de bufer întrerupt, care constă din două geluri contigue, dar distincte: un gel fin sau de separare (de jos) și un gel ferm (de sus). Cele două geluri sunt modelate cu porozități, pH, și putere ionică diferite. În plus, în gel și în buferele pentru electrozi sunt folosiți ioni mobili diferiți. Lipsa de continuitate a buferului are drept scop de a concentra probele cu volum mare în gelul ferm, aceasta rezultând în îmbunătățirea rezoluției. La aplicarea curentului electric, de-a lungul soluției cu proba se dezvoltă o cădere de voltaj, care face ca proteinele să penetreze în gelul ferm. Ionii de glicinat din buferul pentru electrod urmează după proteine în gelul ferm. Se formează rapid un front care se deplasează având în față ionii extrem de mobili de clorură și în spate ionii relativ lenți de glicinat. Între aceste două fronturi de ioni se formează un gradient local de voltaj înalt, determinând complexele SDS-proteină să formeze o zonă subțire și să migreze printre fazele de clorură și glicinat. În limite largi, ținând cont de înălțimea probei aplicate, toate SDS-proteinele se condensează într-o regiune foarte îngustă și intră în gelul fin ca o zonă subțire, strict definită de proteine cu densitate mare. Gelul ferm cu pori mari nu reține migrarea majorității proteinelor și servește în special drept un mediu anticonvectiv. La granița dintre gelul ferm și cel fin, datorită micșorării dimensiunii porilor în gelul fin, are loc o creștere bruscă în retardarea proteinelor. Odată ajunse în gelul fin, mișcarea proteinelor continuă a fi încetinită de matricea cu efect de sită. Ionii de glicinat preiau proteinele, deplasându-se apoi într-un spațiu cu pH uniform, format de tris (hidroximetil) aminometan și glicină. Trecerea prin sita moleculară determină separarea complexelor SDS-poli-peptidă în baza masei lor moleculare.

### PREPARAREA GELURILOR POLIACRILAMIDICE PENTRU BUFERUL SDS ÎNTRERUPT VERTICAL

Asamblarea formei de turnare a gelului. Curățați două plăci de sticlă (dimensiunea: ex. 10 cm x 8 cm), un pieptene din politetrafluoruetilenă, două separatoare și sistemul de tuburi din silicon (diametrul ex. 0.6 mm x 35 cm) cu un detergent moale și clătiți abundant cu apă. Uscați toate obiectele cu un șervet de hârtie sau tifon. Lubrifiați separatoarele și sistemul de tuburi cu ulei fără silicon. Aplicați separatoarele de-a lungul fiecăreia din cele două laturi mici ale plăcii de sticlă, neajungând cu 2 mm la capătul plăcii și 2 mm la latura lungă, corespunzătoare părții de la fund a gelului. Începeți a aranja sistemul de tuburi pe placa de sticlă folosind un separator pentru ghidare. Îndoțiți atent sistemul de tuburi la fund și treceți de-a lungul laturii lungi a plăcii de sticlă. Menținând sistemul de tuburi cu un deget de-a lungul laturii lungi îndoțiți din nou sistemul de tuburi și aranjați-l pe a doua latură mică a plăcii de sticlă, folosind separatorul pentru ghidare. Puneți a doua placă de sticlă, aranjând-o cu mare exactitate și țineți forma de turnare, apăsând cu degetele. Aplicați două amortizoare pe fiecare din cele două laturi mici ale formei. Aplicați atent patru cleme pe latura lungă a formei de turnare a gelului, astfel formând fundul acesteia. Verificați dacă sistemul de tuburi merge de-a lungul laturii marginilor plăcilor de sticlă și dacă nu a ieșit în afară la clamparea lor. Forma de turnare este gata pentru a turna gelul.

**Prepararea gelului.** Deoarece conținutul de acrilamid-bisacrilamid în buferul celor două geluri este diferit, la fel ca și pH-ul lor, la prepararea unui gel poli-acrilamidic pentru buferul SDS întrerupt se recomandă a turna gelul fin, a lăsa gelul să se prindă, apoi a turna gelul ferm.

*Prepararea gelului fin.* Folosind valorile date în Tabelul 14, preparați într-o colbă conică volumul corespunzător de soluție, conținând concentrația dorită de acrilamid pentru un gel fin. Amestecați componentele în ordinea arătată. Acolo unde se cere, înainte de a adăuga soluția de persulfat de amoniu și de tetrametiletildiamin (TEMED), filtrați soluția dacă este necesar în vacuum printr-o membrană din acetat de celuloză (diametrul porilor 0.45  $\mu\text{m}$ ); țineți soluția în vacuum prin rotirea dispozitivului de

filtrare până când în soluție nu se mai formează bule. Adăugați cantități potrivite de soluție de persulfat de amoniu și TEMED, după cum este indicat în Tabelul 14, rotiți și turnați imediat în deschizătura dintre cele două plăci de sticlă ale formei de turnare. Lăsați suficient spațiu pentru gelul ferm (lungimea dintelui de pieptene plus 1 cm). Folosind o pipetă de sticlă îngustată spre vârf, acoperiți atent soluția cu izobutanol saturat cu apă. Lăsați gelul într-o poziție verticală la temperatura camerei pentru a se polimeriza.

*Prepararea gelului ferm.* După completarea polimerizării (aproximativ 30 min), vărsați izobutanolul și spălați de câteva ori partea de sus a gelului cu apă pentru a înlătura stratul de izobutanol și orice rămășițe de acrilamid nepolimerizat. Scurgeți pe cât e posibil lichidul din partea de sus a gelului, apoi înlăturați orice apă restantă cu capătul unui șervet de hârtie.

Folosind valorile date în Tabelul 15, preparați într-o colbă conică volumul corespunzător de soluție, conținând concentrația dorită de acrilamid. Amestecați componentele în ordinea arătată. Acolo unde se cere, înainte de a adăuga soluția de persulfat de amoniu și de tetrametiletildiamin (TEMED), filtrați soluția dacă este necesar în vacuum printr-o membrană din acetat de celuloză (diametrul porilor 0.45 μm); țineți soluția în vacuum prin rotirea dispozitivului de filtrare până când în soluție nu se mai formează bule. Adăugați cantități potrivite de soluție de persulfat de amoniu și TEMED, după cum este indicat în Tabelul 15, rotiți și turnați imediat în deschizătura dintre cele două plăci de sticlă ale formei de turnare direct pe suprafața gelului fin polimerizat. Imediat inserați în soluția de gel ferm un pieptene curat din politetrafluoruetilenă, având grijă să evitați pătrunderea bulelor de aer. Adăugați soluție de gel ferm pentru a umple complet spațiile dintre dinții pieptenului. Lăsați gelul într-o poziție verticală la temperatura camerei pentru a se polimeriza.

**Turnarea gelului în dispozitivul pentru electroforeză și separarea electroforetică.** După completarea polimerizării (aproximativ 30 min), înlăturați cu grijă pieptenele din politetrafluoruetilenă. Spălați imediat adânciturile cu apă sau *SDS-PAGE bufer R* pentru a înlătura orice rămășițe de acrilamid nepolimerizat. Dacă este necesar, îndreptați dinții gelului ferm cu un ac hipodermic bont, atașat la o seringă. Înlăturați clemele la una din laturile mici, scoateți cu grijă sistemul de tuburi și puneți clemele la loc. Procedați la fel la cealaltă latură mică. Înlăturați sistemul de tuburi din partea de la fund a gelului. Montați gelul în dispozitivul de electroforeză. Adăugați bufere de electroforeza în rezervoarele superior și inferior. Înlăturați orice bule blocate la fundul gelului între plăcile de sticlă. Aceasta se poate face cu un ac hipodermic bont, atașat la o seringă. Niciodată nu porniți electroforeza înainte de aplicarea probelor în gel, deoarece aceasta va distruge discontinuitatea sistemelor bufer. Înainte de a introduce proba clățiți cu grijă fanta cu *SDS-PAGE bufer R*. Preparați soluțiile test și de referință în buferul recomandat pentru probă și tratați-le după cum este specificat în monografia individuală. Introduceți un volum potrivit de fiecă soluție în adânciturile gelului ferm. Porniți electroforeza folosind condițiile recomandate de producătorul echipamentului. Producătorii de echipament SDS-PAGE pot livra geluri de diferită arie de suprafață și grosime. Pentru a atinge o separare optimă durata și curentul/voltajul electroforezei s-ar putea să varieze la necesitate după cum este descris de producătorul dispozitivului. Verificați ca frontul colorantului să se deplaseze în gelul fin. Atunci când colorantul atinge fundul gelului, opriți electroforeza. Înlăturați montura cu gel din dispozitiv și separați plăcile din sticlă. Înlăturați separatoarele, tăiați și aruncați gelul ferm și treceți imediat la colorare.

#### PREPARAREA GELULUI FIN

Tabelul 14

Componentele soluției	Volumele componentelor (ml) per volum al formei de turnare a gelului							
	10 ml	15ml	20ml	25ml	30ml	40ml	50 ml	

6 % acrilamid								
Apă R	2.6	5.3	7.9	10.6	13.2	15.9	21.2	26.5
Soluție de acrilamid	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	8.0	10.0
1.5MTris(pH 8.8) <sup>(2)</sup>	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
100 g/l SDS <sup>(3)</sup>	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
100 g/l ADS <sup>(4)</sup>	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED <sup>(5)</sup>	0.004	0.008	0.012	0.016	0.02	0.024	0.032	0.04
8 % acrilamid								
Apă R	2.3	4.6	6.9	9.3	11.5	13.9	18.5	23.2
Soluție de acrilamid	1.3	2.7	4.0	5.3	6.7	8.0	10.7	13.3
1.5MTris(pH 8.8) <sup>(2)</sup>	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
100 g/l SDS <sup>(3)</sup>	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
100 g/l ADS <sup>(4)</sup>	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED <sup>(5)</sup>	0.003	0.006	0.009	0.012	0.015	0.018	0.024	0.03
10 % acrilamid								
Apă R	1.9	4.0	5.9	7.9	9.9	11.9	15.9	19.8
Soluție de acrilamid	1.7	3.3	5.0	6.7	8.3	10.0	13.3	16.7
1.5MTris(pH 8.8) <sup>(2)</sup>	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
100 g/l SDS <sup>(3)</sup>	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
100 g/l ADS <sup>(4)</sup>	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED <sup>(5)</sup>	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02
12 % acrilamid								
Apă R	1.6	3.3	4.9	6.6	8.2	9.9	13.2	16.5
Soluție de acrilamid	2.0	4.0	6.0	8.0	10.0	12.0	16.0	20.0
1.5MTris(pH 8.8) <sup>(2)</sup>	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
100 g/l SDS <sup>(3)</sup>	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
100 g/l ADS <sup>(4)</sup>	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED <sup>(5)</sup>	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02
14 % acrilamid								
Apă R	1.4	2.7	3.9	5.3	6.6	8.0	10.6	13.8
Soluție de acrilamid	2.3	4.6	7.0	9.3	11.6	13.9	18.6	23.2
1.5MTris(pH 8.8) <sup>(2)</sup>	1.2	2.5	3.6	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
100 g/l SDS <sup>(3)</sup>	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
100 g/l ADS <sup>(4)</sup>	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED <sup>(5)</sup>	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02
15 % acrilamid								
Apă R	1.1	2.3	3.4	4.6	5.7	6.9	9.2	11.5
Soluție de acrilamid	2.5	5.0	7.5	10.0	12.5	15.0	20.0	25.0
1.5MTris(pH 8.8) <sup>(2)</sup>	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
100 g/l SDS <sup>(3)</sup>	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
100 g/l ADS <sup>(4)</sup>	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED <sup>(5)</sup>	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02

(1) Soluție de acrilamid: Soluție de acrilamid/ bisacrilamid R 30 % (29:1)

(2) 1.5MTris(pH 8.8): Soluție bufer tris-hidroclorid R cu pH 8.8

(3) 100 g/l SDS: soluție 100 g/l de sulfat dodecilat de sodiu R

(4) 100 g/l ADS: soluție 100 g/l de *persulfat de amoniu R*. Persulfatul de amoniu este sursa de radicali liberi, care asigură polimerizarea acrilamid/ bisacrilamidului. Deoarece soluțiile de persulfat de amoniu se descompun lent, soluțiile proaspete trebuie să fie preparate săptămânal.

(5) TEMED: *tetrametiletildiamin R*

#### PREPARAREA GELULUI FERM

Tabelul 15

Componentele soluției	Volumele componentelor (ml) per volum al formei de turnare a gelului							
		2 ml	3ml	4ml	5ml	6ml	8ml	10ml
Apă R	0.68	1.4	2.1	2.7	3.4	4.1	5.5	6.8
Soluție de acrilamid	0.17	0.33	0.5	0.67	0.83	1.0	1.3	1.7
1.5MTris(pH 6.8) <sup>(2)</sup>	0.13	0.25	0.38	0.5	0.63	0.75	1.0	1.25
100 g/l SDS <sup>(3)</sup>	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.1
100 g/l ADS <sup>(4)</sup>	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.1
TEMED <sup>(5)</sup>	0.001	0.002	0.003	0.004	0.005	0.006	0.008	0.01

(1) *Soluție de acrilamid: Soluție de acrilamid/ bisacrilamid R 30 % (29:1)*

(2) 1.5MTris(pH 6.8): *Soluție bufer tris-hidroclorid R cu pH 6.8*

(3) 100 g/l SDS: soluție 100 g/l de *sulfat dodecilat de sodiu R*

(4) 100 g/l ADS: soluție 100 g/l de *persulfat de amoniu R*. Persulfatul de amoniu este sursa de radicali liberi, care asigură polimerizarea acrilamid/ bisacrilamidului. Deoarece soluțiile de persulfat de amoniu se descompun lent, soluțiile proaspete trebuie să fie preparate săptămânal.

(5) TEMED: *tetrametiletildiamin R*

#### DETECTAREA PROTEINELOR ÎN GELURI

Colorarea cu Coomassie este cea mai frecvent folosită metodă de colorare a proteinelor cu un nivel de detectare de aproximativ 1 µg - 10 µg de proteină per bandă. Colorarea cu argint este cea mai sensibilă metodă de colorare a proteinelor în geluri, putând detecta o bandă conținând 10 ng - 100 ng.

Toate etapele de colorare a gelului sunt efectuate la temperatura camerei prin scuturare ușoară (ex. pe o platformă orbitală mișcătoare) în orice container convenabil. La colorarea gelurilor se vor îmbrăca mănuși, deoarece în caz contrar amprente digitale se vor colora și ele.

**Colorarea cu Coomassie.** Imersionați gelul într-o cantitate mare de *soluție de colorare Coomassie R* și lăsați-l să stea timp cel puțin 1 oră. Înlăturați soluția de colorare.

Decolorați gelul cu o cantitate mare de *soluție de decolorare R*. Schimbați *soluția de decolorare* de câteva ori, până când benzile de proteină colorată se deslușesc clar pe un fundal deschis la culoare. Cu cât mai minuțios este decolorat gelul, cu atât mai mică este cantitatea de proteină care poate fi detectată prin această metodă. Decolorarea poate fi accelerată prin introducerea în *soluția de decolorare R* a câtorva grame de rezină cu schimb de anioni sau a unui burete mic.

NOTĂ: soluțiile de acid-alcool folosite în această procedură nu fixează complet proteinele în gel. Aceasta poate duce la pierderea unor proteine cu masă moleculară mică în timpul colorării și decolorării gelurilor subțiri. Fixarea permanentă poate fi obținută, lăsând gelul să stea într-un amestec din 1 parte de

acid tricloroacetic R, 4 părți de metanol R și 5 părți de apă R timp de 1 oră înainte de imersionarea în soluție de colorare Coomassie R.

**Colorarea cu argint.** Imersionați gelul într-o cantitate mare de *soluție de fixare R* și lăsați-l să stea timp de 1 oră. Înlăturați soluția de fixare, adăugați soluție proaspătă de fixare și incubați fie timp de cel puțin 1 oră, fie peste noapte, dacă aceasta este convenabil. Aruncați soluția de fixare și spălați gelul într-o cantitate mare de *apă R* timp de 1 oră. Muiati gelul pentru 15 min într-o soluție de *glutaraldehydă R* de 1 % V/V. Spălați gelul de două ori timp de 15 min într-o cantitate mare de *apă R*. Muiati gelul în reagent proaspăt de *nitrat de argint R* timp de 15 min, la întuneric. Spălați gelul de trei ori timp de 5 min într-o cantitate mare de *apă R*. Imersionați gelul pentru aproximativ 1 min în *soluție de developant R* până la obținerea unei colorări satisfăcătoare. Opriti developarea prin incubare în soluție blocantă R timp de 15 min. Clătiți gelul cu *apă R*.

## USCAREA GELURILOR POLIACRILAMIDICE SDS COLORATE

În funcție de metoda de colorare folosită, gelurile sunt tratate într-un mod puțin diferit. Pentru colorarea cu Coomassie, după etapa de decolorare, lăsați gelul să stea timp de cel puțin 2 ore (este posibilă incubarea peste noapte) într-o soluție de *glicerol R* 100 g/l. Pentru colorarea cu argint, adăugați la clătirea finală o etapă de clătire de 5 min într-o soluție de *glicerol R* 20 g/l.

Imersionați două folii de film din celuloză poroasă în *apă R* și incubați timp de 5 min - 10 min. Puneți una din folii pe o ramă de uscarea. Ridicați cu grijă gelul și puneți-l pe filmul din celuloză. Înlăturați orice bule blocate de aer și turnați câțiva mililitri de *apă R* în jurul marginilor gelului. Puneți a doua folie pe partea de sus și înlăturați orice bule blocate de aer. Completați montura de pe rama de uscarea. Puneți într-un cuptor sau lăsați la temperatura camerei până la uscare.

## DETERMINAREA MASEI MOLECULARE

Masele moleculare ale proteinelor sunt determinate prin compararea mobilităților lor cu cele ale unor proteine – markeri cu masă moleculară cunoscută. Pentru calibrarea gelurilor sunt disponibile amestecuri de proteine cu masă moleculară cunoscută exact, preparate pentru colorare uniformă. Acestea există în diapazoane variate de masă moleculară. Soluțiile stoc de proteine concentrate cu masă moleculară cunoscută sunt diluate într-o cantitate adecvată de bufer și introduse în același gel ca proba de proteină ce urmează a fi studiată.

Imediat după ce s-a acționat asupra gelului, se fixează poziția frontului de colorant albastru de bromofenol pentru a identifica marginea anterioară a frontului electroforetic de ioni. Această poate fi efectuat prin aplicarea unor creștături în marginile gelului sau prin inserarea unui ac muiat în tuș în gel de-a lungul frontului de colorant. După colorare, măsurați distanțele de migrare a fiecărei benzi de proteină (markeri și necunoscute) de la partea superioară a gelului fin. Împărțiți distanța de migrare a fiecărei proteine la distanța parcursă prin colorant. Distanțele de migrare normalizate, obținute astfel, sunt numite mobilități relative ale proteinelor (relative față de frontul colorantului) și notate convențional cu  $R_f$ . Construiți un grafic al logaritmilor maselor moleculare relative ( $M_r$ ) a standardelor de proteină ca funcție a valorilor  $R_f$ . Observați că graficele sunt ușor sigmoide. Atâta timp cât valorile obținute pentru probele necunoscute se află de-a lungul părții liniare a graficului, masele moleculare necunoscute pot fi estimate prin analiza de regresie liniară sau prin interpolarea curbilor  $\log M_r$  față de  $R_f$ .

## VALIDAREA TESTULUI

Testul nu este valabil fără ca proteinele marker-ului masei moleculare să fie distribuite de-a lungul a 80 % din lungimea gelului și peste diapazonul necesar de separare (ex. diapazonul care cuprinde produsul și dimerul său sau produsul și impuritățile datorate lui), iar separarea obținută pentru benzile relevante de

proteină nu prezintă o dependență liniară dintre logaritmul masei moleculare și  $R_f$ . Luând în considerație soluția testată, în monografiile individuale pot fi specificate cerințe suplimentare de validare.

### CUANTIFICAREA IMPURITĂȚILOR

Dacă în monografia individuală este specificată o limită de impuritate, prin diluarea soluției test se va prepara o soluție de referință corespunzătoare acelui nivel de impuritate. De exemplu, dacă limita este 5 %, soluția de referință va reprezenta o diluție 1:20 a soluției test. Nici o impuritate (orice bandă cu excepția celei principale) în electroforetograma, obținută cu soluție test, nu poate fi mai intensă decât banda principală, obținută cu soluție de referință.

În condiții validate impuritățile pot fi cuantificate prin normalizarea până la banda principală, folosind un densitometru integrator. În acest caz, rezultatele trebuie să fie validate pentru liniaritate.

## 2. METODELE IMUNOCHIMICE:

### 2.1. DETERMINAREA STRUCTURII ANTIGENICE A PREPARATELOR SERICE PRIN METODA IMUNOELECTROFOREZEI.

Metoda se bazează pe proprietatea particulelor încărcate de a se deplasa în gel de agar sub acțiunea unui câmp electric. Ulterior se efectuează analiza fracțiilor obținute prin metoda dublei difuzii în agar. Antiserul specific se introduce într-un șanț longitudinal, paralel cu direcția separării electroforetice a fracțiilor proteice. În urma difuziei reactanților, la locul de întâlnire a zonelor de difuzie a antigenilor cu cele ale anticorpilor, se formează linii de precipitare. Numărul de aceste linii reflectă puritatea preparatului. Metoda este recomandată pentru preparate de imunoglobulină.

#### Modul de lucru

Pe o lamă de sticlă cu dimensiunile de 120x90 mm se întinde în strat subțire de 2-3 mm 18-20ml gel lichid de agar cu concentrația de 1,25 %. După întărirea gelului de agar se sapă godeuri mici, folosind pentru aceasta o ștanță (vezi desenul).

Cu ajutorul unui capilar preparatele de cercetat se introduc în godeuri. Într-unul din godeuri se introduce ser normal.

Cuva de electroforeză se umple cu soluție tampon cu barbital (pH 8,2). Lamele cu gel de agar se introduc în aparatul de electroforeză. La ambele capete ale lamelor se pun fâșii de hârtie cromatografică de filtru cu dimensiunile de 120x60 mm, pliată în 5-6 straturi, care se unesc cu camerele cu electrozi. Electroforeza se efectuează la o intensitate a curentului de 10 mA și tensiune de 100 V timp de 1,0-1,5 ore.

După expirarea timpului și separarea electroforetică între godeuri se sapă șanțuri longitudinale, în care se pune antiserul, care ulterior precipitează proteinele serice. Lama se introduce în camera umedă, în care se pune și o boxă cu apă și câteva cristale de fenol. Peste 24-48 ore lama se scoate din camera umedă, se imersionează într-o chiuvetă cu soluție de clorură de sodiu 0,9% (conservant - câteva cristale de fenol) și se spală timp de 2-3 zile de proteinele, care nu au participat la formarea precipitatului. Soluția se schimbă de 3-4 ori pe zi.

Lamele spălate se usucă în aer liber. Pentru o uscure uniformă lamele cu gel de agar se acoperă cu hârtie de filtru, iar pentru a accelera procesul de uscure de asupra godeurilor și șanțurilor longitudinale



hârtia se străpunge cu acul. În scop de accelerare a procesului de uscare se poate folosi un ventilator. După uscarea lamelor hârtia se umezește cu apă și se înlătură.

După uscarea gelului de agar lamele se colorează timp de 2 ore în soluție de revelare.

Excesul de colorant se îndepărtează cu soluție de acid acetic 2% timp de 2 zile până la dispariția completă a fundalului color.

Se analizează localizarea și numărul liniilor de precipitare ale preparatelor de imunoglobulină în raport cu liniile de precipitare ale serului sangvin, care trebuie să releveze nu mai puțin de 15 linii de precipitare cu antiserul. Aprecierea calității fiecărei serii noi de antiser se efectuează cu standardul sistemului de testare pentru determinarea structurii antigenice a preparatelor serice umane prin metoda imunoelectroforezei.

#### Notă:

#### 1. Prepararea gelului de agar de 1,25%.

Într-un vas de sticlă cu capacitatea de 1lit se introduc 12,5 g de agar, se adaugă 500 ml apă și se lasă timp de o oră la temperatura de 18-20°C pentru ca gelul să se umfle. Se introduce vasul în baia de apă clocotindă și se ține până la topirea completă a agarului. Volumul soluției de gel se aduce cu apă la 500 ml, apoi se adaugă un volum egal de soluție tampon cu barbital (pH 8,2). (concentrațiile de sare și acid, indicate în p.2 urmează a fi dublate). Soluția de agar se filtrează prin 2-3 straturi de tifon, se adaugă mertiolat până la concentrația de 100 mcg/ml și se repartizează în flacoane a câte 40-50 ml (cantitate suficientă pentru două lame). Agarul topit trebuie să fie transparent.

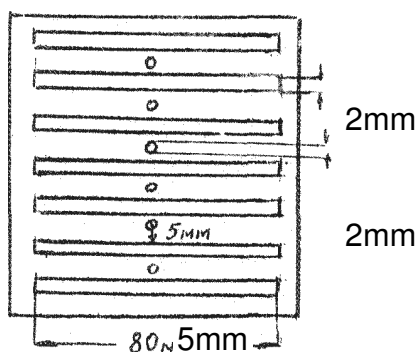
#### 2. Prepararea soluției tampon cu barbital (pH 8,2)

În 4,3 l apă se dizolvă 47,6 g de barbital-natriu și 69 ml acid clorhidric cu concentrația de 1mol/l.

#### 3. Prelucrarea lamelor de sticlă

Pe lamele de sticlă (de preferință lame foto), prelucrate cu un amestec cromat, se întind în strat subțite câteva picături de gel topit de agar de 1,25% (pentru ca gelul să adere mai bine la sticlă), lama se usucă la temperatura de 75-80

4. Prepararea lamelor cu gel de agar Lamele de sticlă se pun pe o suprafață orizontală și peste ele se toarnă cu mare grijă, evitând formarea de bule de aer, gel de agar de 1,25%, topit la temperatura de 60-80 °C. În gel se sapă godeuri mici pentru probele analizate, iar după separarea electroforetică - șanțuri longitudinale pentru serul imun precipitant (vezi desenul)



80mm

Figura 1. Schema lamei pentru imunoelectroforeză

Șanțurile longitudinale se sapă, folosind pentru aceasta un cuțit special, iar godeurile pentru antigen se sapă folosind o pipetă Pasteur, tăiată transversal. Godeurile și șanțurile longitudinale se pot sapa punând lama pe o coală de hârtie cu desen gata sau folosind pentru aceasta o ștanță (o cutiuță cu capac detașabil), pe care sunt deja săpate șanțuri longitudinale și godeuri).

#### 5. Prepararea colorantului

negru amid 10B -1,0 g, 450 ml soluție de acid acetic cu concentrația de 0,1 mol/l, 550 ml soluție de acetat de natriu cu concentrația de 0,1 mol/l.

#### 6. Prepararea soluției de acid acetic 2 %.

Într-un cilindru cotat cu capacitatea de 1l se introduc 20 ml de acid acetic rece, se aduce la semn cu apă.

## 2.2. DETERMINAREA A ENDOTOXINELOR BACTERIENE

Testul la endotoxine bacteriene este folosit pentru a detecta sau cuantifica endotoxinele de origine bacteriană gram-negativă, folosind lizat de amibocit din crevete (*Limulus polyphemus* sau *Tachypleus tridentatus*). Există trei tehnici pentru acest test: tehnica de gelație, bazată pe formarea unui coloid; tehnica turbidimetrică, bazată pe apariția opacifierii după separarea unui substrat endogen; și tehnica cromogenă, bazată pe apariția culorii după separarea unui complex sintetic peptido-cromogen.

Capitolul descrie următoarele șase metode:

- Metoda A. Metoda de Gelație: test limită
- Metoda B. Metoda de Gelație: test semi-cantitativ
- Metoda C. Metoda turbidimetrică cinetică
- Metoda D. Metoda cromogenă cinetică
- Metoda E. Metoda punctului final Cromogen
- Metoda F. Metoda punctului final Turbidimetric

Pentru a efectua testul folosiți oricare din aceste șase metode. În caz că aveți îndoieli sau dezacorduri, decizia finală se va lua în baza metodei A, cu excepția situațiilor, când în monografiile se indică o altă metodă. Testul este efectuat în 3 moduri, care permit a evita contaminarea cu endotoxine.

#### Vasele

Depirogenizați toată sticlăria și alte vase termorezistente într-un pupinel, folosind un proces validat. Minimumul obișnuit folosit de timp și temperatură este de 30 minute la 250°C. Dacă utilizați vase din plastic, cum ar fi plăcile pentru microtitrare și vârfurile de pipete pentru titratoare automate, folosiți vase fără endotoxine detectabile și materiale cu efecte de interferență pentru test.

NOTĂ: În acest capitol, termenul "vas" include toate tipurile de recipiente, de exemplu adânciturile plăcii pentru microtitrare.

## Prepararea soluției standard de rezervă de endotoxină.

Soluția standard de rezervă de endotoxină este preparată din endotoxină standard de referință care a fost verificată în conformitate cu Standardul Internațional, de exemplu *standardul BRP pentru endotoxine*.

Endotoxina este exprimată în Unități internaționale (UI). Echivalența în Unități Internaționale a Standardului Internațional este stabilită de Organizația Mondială a Sănătății.

*NOTĂ: O Unitate Internațională (UI) de endotoxină este egală cu o Unitate de Endotoxină (U.E.).*

Pentru prepararea și păstrarea soluției standard de rezervă de endotoxină urmați specificațiile din foaia de însoțire a ambalajului și de pe etichetă.

### *Prepararea soluțiilor standard de endotoxină*

După agitare energetică a soluției standard de rezervă de endotoxină, preparați diluțiile corespunzătoare în serie a acestei soluții, folosind apă pentru testul la endotoxine bacteriene (apă pentru TEB).

Folosiți soluțiile cât mai degrabă posibil pentru a evita pierderea activității lor prin adsorbție.

### *Prepararea soluțiilor-test*

Preparați soluțiile-test prin dizolvarea sau diluarea substanțelor active sau a produselor medicinale, folosind apă pentru TEB. Unele substanțe sau compoziții pot fi mai bine dizolvate sau diluate în alte soluții apoase. Dacă este necesar, ajustați pH-ul soluției-test (sau diluției acesteia) astfel încât pH-ul amestecului de lizat și de soluție-test să se plaseze în diapazonul de pH specificat de producătorul lizatului.

Acesta de obicei se află în diapazonul de pH cuprins între 6.0 și 8.0. pH-ul poate fi ajustat prin folosirea unui acid, a unei baze sau a unui bufer potrivit, după cum este recomandat de producătorul lizatului. Acizii și bazele pot fi preparate din substanțe concentrate sau solide și apă pentru TEB în containere fără endotoxine detectabile. Buferele trebuie să fie verificate la lipsa de endotoxine detectabile și factori de interferență.

### *Determinarea Diluției maxime valabile*

Diluția maximă valabilă (DMV) este diluția maximă admisibilă a unei probe, la care poate fi determinată limita de endotoxină. Determinați DMV folosind următoarea expresie:

$$MDV = \frac{\text{limita de endotoxină} \times \text{concentrația soluției-test}}{\lambda}$$

*Limita de endotoxină:* limita de endotoxină pentru substanțele active administrate parenteral, definită în baza dozei, este egală cu:  $\underline{K}$

$M$

$K$  = doza pirogenă inițială de endotoxină per kilogram masă corp într-o perioadă de o singură oră,

$M$  = doza maximă recomandată a produsului per kilogram masă corp într-o perioadă de o singură oră.

În monografiile limita de endotoxină pentru substanțele active administrate parenteral este exprimată în unități ca UI/ml, UI/mg, UI/Unitate de activitate biologică, etc.

*Concentrația soluției-test:*

- în mg/ml dacă limita de endotoxină este exprimată prin masă (UI/mg).

- în Unități/ml dacă limita de endotoxină este exprimată prin unități de activitate biologică (UI/Unitate),

- în ml/ml dacă limita de endotoxină este exprimată prin volum (UI/ml).

$\lambda$  = sensibilitatea lizatului marcat în tehnica de gelație (UI/ml) sau cel mai jos punct, folosit în curbele standard ale tehnicilor turbidimetrică sau cromogenă.

#### TEHNICA DE GELAȚIE (METODELE A ȘI B)

Tehnica de gelație permite detectarea sau cuantificarea endotoxinelor și este bazată pe gelarea lizatului în prezența endotoxinelor. Concentrația de endotoxine, necesară pentru a produce gelarea lizatului în condiții standard, se numește sensibilitate a lizatului marcat. Pentru a asigura atât precizia, cât și valabilitatea testului, verificați sensibilitatea lizatului marcat și efectuați testul la factori de interferență după cum este descris în p.1. Pregătirea pentru testare.

### 1. PREGĂTIREA PENTRU TESTARE

#### Confirmarea sensibilității lizatului marcat

Înainte de a folosi soluția de lizat pentru testare, verificați sensibilitatea  $\lambda$ , exprimată în UI/ml. Confirmarea sensibilității lizatului se efectuează la începerea unei noi partide de lizat sau la oricare modificare a condițiilor experimentale, care poate afecta rezultatul testului.

Preparați soluțiile standard de cel puțin patru concentrații echivalente cu  $2\lambda$ ,  $\lambda$ ,  $0.5\lambda$  și  $0.25\lambda$  prin diluarea soluției standard de rezervă de endotoxină cu apă pentru TEB.

Amestecați un anumit volum de soluție de lizat cu volum egal a uneia din soluțiile standard (cum ar fi 0.1 ml alicot) în fiecare vas. La folosirea sticlulelor sau ampulelor, ce conțin lizat liofilizat pentru un singur test, adăugați soluțiile direct în sticlulă sau ampulă. Incubați amestecul de reacție o perioadă constantă conform recomandărilor producătorului lizatului (de obicei la  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  timp de  $60 \pm 2$  min), evitând vibrația. Testați integritatea gelului: pentru vase, luați pe rând fiecare vas direct din incubator și întoarceți-l cu o mișcare lentă la aproximativ  $180^\circ$ . Dacă s-a format un gel ferm, care rămâne în loc la inversie, calificați rezultatul drept unul pozitiv. Dacă nu se formează un gel intact rezultatul este negativ.

Testul nu este considerat valabil până când cea mai joasă concentrație a soluțiilor standard nu arată un rezultat negativ în toate testele replicate.

Punctul final este ultimul rezultat pozitiv în seriile cu concentrații descrescătoare de endotoxină. Calculați valoarea medie a logaritmilor punctului final de concentrații, apoi antilogaritmul valorii medii, folosind următoarea expresie:

$$\text{Media geometrică a concentrației punctului final} = \text{antilog} \frac{\sum e}{f}$$

$\sum e$  = suma logaritmilor concentrațiilor punctului final a seriilor de diluție folosite,

$f$  = numărul de replicații.

Media geometrică a concentrației punctului final este sensibilitatea măsurată a soluției de lizat (UI/ml). Dacă aceasta nu este mai mică de  $0.5\lambda$  și nu mai mare de  $2\lambda$ , sensibilitatea se consideră confirmată și soluția este folosită în teste, efectuate cu acest lizat.

### Testul la factori de interferență

Preparați soluțiile A, B, C și D după cum este arătat în Tabelul 16 și folosiți soluții-test la o diluție mai mică de DMV, care nu conțin endotoxine detectabile, procedând după cum este descris în p.1. Pregătirea pentru testare.

#### CONFIRMAREA SENSIBILITĂȚII LIZATULUI MARCAT.

Tabelul 16

Soluție	Concentrația de endotoxină/ Soluția la care se adaugă endotoxina	Diluent	Factorul de diluție	Concentrația inițială de endotoxină	Numărul de replicare
A	Nici una / Soluție-test diluată	-	-	-	4
B	2 $\lambda$ / Soluție-test diluată	<i>Soluție-test</i>	1	2 $\lambda$	4
			2	1 $\lambda$	4
			4	0.5 $\lambda$	4
			8	0.25 $\lambda$	4
C	2 $\lambda$ / Apă pentru TEB	Apă pentru TEB	1	2 $\lambda$	2
			2	1 $\lambda$	2
			4	0.5 $\lambda$	2
			8	0.25 $\lambda$	2
D	Nici una / Apă pentru TEB	-	-	-	2

Soluția A soluție a compoziției examinate, fără endotoxine detectabile.

Soluția B testul la interferențe.

Soluția C controlul sensibilității lizatului marcat.

Soluția D soluție de control cu rezultat negativ (Apă pentru TEB).

Media geometrică a concentrațiilor punctului final al soluțiilor B și C este determinată folosind expresia descrisă în p.1. Pregătirea pentru testare, (i) Confirmarea sensibilității lizatului marcat.

Testul la factori de interferență este repetat la oricare modificare a condițiilor experimentale, care poate influența rezultatul testului.

Testul nu este valabil fără ca toate replicarele soluțiilor A și D să arate lipsa reacției, iar rezultatul cu soluția C să confirme sensibilitatea lizatului marcat. Dacă sensibilitatea lizatului marcat, determinată cu soluția B, nu este mai mică de 0.5 $\lambda$  și nu mai mare de 2 $\lambda$ , soluția-test nu conține factori de interferență în condițiile

experimentale folosite. În caz contrar, soluția interferează cu testul. Dacă compoziția examinată interferează cu testul la o diluție mai mică de DMV, repetați testul la factori de interferență, folosind o diluție mai mare, care nu depășește DMV. Folosirea unui lizat mai sensibil permite o diluție mai mare a compoziției examinate și aceasta poate contribui la eliminarea interferenței. Interferență poate fi eliminată prin tratarea adecvată a soluției, cum ar fi filtrarea, neutralizarea, dializa sau tratarea cu căldură. Pentru a stabili dacă tratamentul selectat elimină efectiv interferență fără pierdere de endotoxine, repetați testul la factori de interferență folosind compoziția examinată, la care s-a adăugat endotoxină standard și care apoi a fost supusă tratamentului selectat.

## TESTUL LIMITĂ (METODA A)

### Procedura

Preparați soluțiile A, B, C și D după cum este arătat în Tabelul 17, și efectuați testul cu aceste soluțiile urmând procedura descrisă în p.1.

### CONFIRMAREA SENSIBILITĂȚII LIZATULUI MARCAT.

Tabelul 17

Soluție	Concentrația de endotoxină/ Soluția la care se adaugă endotoxina	Numărul de replicare
A	Nici una/ soluție-test diluată	2
B	2λ/ soluție-test diluată	2
C	2λ/ Apă pentru TEB	2
D	Nici una/ Apă pentru TEB	2

Preparați soluția A și soluția B (soluții de control a produsului cu rezultat pozitiv) folosind o diluție nu mai mare de DMV și tratamentele descrise în p.1. Pregătirea pentru testare, (ii) Testul la factori de interferență. Soluțiile B și C (soluții de control cu rezultat pozitiv) conțin endotoxină standard la o concentrație corespunzătoare dublării sensibilității lizatului marcat. Soluția D (soluție de control cu rezultat negativ) constă din apă pentru TEB.

### Interpretarea

Testul nu este valabil fără ca ambele replicare ale celor două soluții de control cu rezultat pozitiv B și C să fie pozitiv, iar ale soluției de control cu rezultat negativ D - negativ.

Compoziția examinată îndeplinește condițiile testului atunci când pentru ambele replicare ale soluției A rezultatul este negativ.

Rezultatul pentru ambele replicare ale soluției A este pozitiv:

- dacă compoziția examinată este diluată la DMV, aceasta nu satisface condițiile testului,
- dacă compoziția examinată este diluată la o diluție de mai mică de DMV, testul se va repeta la o diluție nu mai mare de DMV.

Dacă pentru un replicat al soluției A rezultatul este pozitiv, iar pentru altele rezultatul este negativ, repetați testul.

Compoziția examinată îndeplinește condițiile testului atunci când la repetarea testului pentru ambele replicare ale soluției A rezultatul este negativ

### TESTUL SEMI-CANTITATIV (METODA B)

#### Procedura

Testul cuantifică endotoxinele bacteriene în soluția-test prin titrare până la un punct final. Preparați soluțiile A, B, C și D după cum este arătat în Tabelul 18, și testați aceste soluții conform procedurii descrise în p.1. Pregătirea pentru testare, Confirmarea sensibilității lizatului marcat.

#### Calculul și interpretarea

Testul nu este valabil fără ca să fie îndeplinite următoarele trei condiții:

- (a) ambele replicare ale soluției D (soluție de control cu rezultat negativ) sunt negative,
- (b) ambele replicare ale soluției B (soluții de control cu rezultat pozitiv) sunt pozitive,
- (c) media geometrică a concentrației punctului final al soluției C este în diapazonul de  $0.5\lambda - 2\lambda$ .

### CONFIRMAREA SENSIBILITĂȚII LIZATULUI MARCAT.

Tabelul 18

Soluție	Concentrația de endotoxină / Soluția la care se adaugă endotoxina	Diluent	Factorul de diluție	Concentrația inițială de endotoxină	Numărul de replicare
A	Nici una / Soluție-test	Apă pentru TEB	1	-	2
			2	-	2
			4	-	2
			8	-	2
B	2 $\lambda$ / Soluție-test		1	2 $\lambda$	2
C	2 $\lambda$ / Apă pentru TEB	Apă pentru TEB	1	2 $\lambda$	2
			2	1 $\lambda$	2
			4	0.5 $\lambda$	2
			8	0.25 $\lambda$	2
D	Nici una / Apă pentru TEB	-	-	$\lambda$	2

**Soluția A** = soluție-test la o diluție, care nu depășește DMV, cu care a fost efectuat testul la factori de interferență. Diluția consecutivă a soluției-test nu trebuie să depășească DMV. Folosiți apă pentru TEB pentru a obține seriile de diluție de 1, 1/2, 1/4 și 1/8, corespunzătoare diluției cu care a fost efectuat testul la factori de interferență. La necesitate pot fi folosite alte diluții.

**Soluția B** = soluție A, conținând endotoxină standard la o concentrație de  $2\lambda$  (soluție de control cu rezultat pozitiv),

**Soluția C** = două serii de apă pentru TEB, conținând endotoxină standard la concentrații de  $2\lambda$ ,  $\lambda$ ,  $0.5\lambda$  și  $0.25\lambda$ .

**Soluția D** = apă pentru TEB (soluție de control cu rezultat negativ).

Pentru a determina concentrația de endotoxină în soluția A, calculați concentrația punctului final pentru seriile de diluții a fiecărui replicat prin înmulțirea fiecărui factor de diluție a punctului final cu  $\lambda$ .

Concentrația de endotoxină în soluția-test este media geometrică a concentrației punctului final a replicatelor (vedeți expresia dată în p.1. Pregătirea pentru testare, (i) Confirmarea sensibilității lizatului marcat). Dacă testul este efectuat cu o soluție-test diluată, calculați concentrația de endotoxină în soluția originală prin înmulțirea rezultatului cu factorul de diluție.

Dacă nici una din diluțiile soluției-test nu este pozitivă într-un test valabil, considerați că concentrația de endotoxină este mai mică de  $\lambda$  (sau, dacă a fost testată o probă diluată, drept fiind mai mică de  $\lambda$  x cel mai mic factor de diluție al probei). Dacă toate diluțiile sunt pozitive, concentrația de endotoxină este considerată a fi egală sau mai mare decât cel mai mare factor de diluție înmulțit cu  $\lambda$  (ex. în Tabelul 18, factorul de diluție inițială x 8 x  $\lambda$ ).

Prepararea corespunde cerințelor testului dacă concentrația de endotoxină este mai mică de cea specificată în monografia individuală.

## **TEHNICILE FOTOMETRICE (METODELE C, D, E ȘI F)**

### **TEHNICA TURBIDIMETRICĂ (METODELE C ȘI F)**

Această tehnică reprezintă un test fotometric de măsurare a creșterii opalescenței. În funcție de principiile, aplicate în test, această tehnică este clasificată ca fiind un test al punctului final turbidimetric sau un test turbidimetric cinetic.

Testul punctului final turbidimetric (Metoda F) este bazat pe dependența cantitativă dintre concentrația de endotoxină și opalescența (absorbanța sau transmiterea) amestecului de reacție la sfârșitul perioadei de incubare.

Testul turbidimetric cinetic (Metoda C) este o metodă de măsurare fie a timpului (timpului de amorsare), necesar pentru ca amestecul de reacție să atingă o absorbanță predeterminată, fie a ratei de apariție a opalescenței.

Testul este efectuat la temperatura de incubare recomandată de producătorul lizatului (de obicei  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ ).

### **TEHNICA CROMOGENĂ (METODELE D ȘI E)**



Această tehnică este folosită pentru a măsura cromoforul eliberat dintr-un peptid cromogenic în timpul reacției endotoxinelor cu lizatul. În funcție de principiile, aplicate în test, această tehnică este clasificată ca fiind un test al punctului final cromogen sau test cromogen cinetic. Testul punctului final cromogen (Metoda E) este bazat pe dependența cantitativă dintre concentrația de endotoxină și cantitatea de cromofor, eliberat la sfârșitul perioadei de incubare.

Testul cromogen cinetic (Metoda D) măsoară fie timpul (timpul de amorsare), necesar pentru ca amestecul de reacție să atingă o absorbantă predeterminată, fie rata de apariție a culorii.

Testul este efectuat la temperatura de incubare recomandată de producătorul lizatului (de obicei  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ ).

### **PREGĂTIREA PENTRU TESTARE**

Pentru a asigura precizia sau valabilitatea testelor turbidimetric și cromogen, se efectuează pregătirea pentru testare în scop de asigurare a faptului că sunt satisfăcute criteriile pentru curba standard și că soluția-test nu interferează cu testul.

Validarea metodei de testare este necesară la oricare modificare a condițiilor experimentale, care poate influența rezultatul testului.

#### **Asigurarea criteriilor curbei standard**

Folosind soluția standard de endotoxină, preparați cel puțin trei concentrații de endotoxine pentru a crea curba standard. Efectuați testul, folosind cel puțin trei replicare de fiecare soluție de endotoxină standard după cum este recomandat de producătorul lizatului (raporturile de volum, timpul de incubare, temperatura, pH. etc.).

Dacă în metodele cinetice diapazonul dorit este mai mare de 2 log, este necesar a include standarde suplimentare pentru a lua în considerație fiecare log de creștere în diapazonul curbei standard.

Valoarea absolută a coeficientului de corelație  $|r|$  trebuie să fie mai mare sau egală cu 0.980, pentru diapazonul de concentrație de endotoxine, indicat de producătorul lizatului.

#### **Testul la factori de interferență**

Selectați o concentrație de endotoxină din mijlocul curbei standard de endotoxină.

Preparați soluțiile A, B, C și D după cum este arătat în Tabelul 19. Efectuați testul cu cel puțin două replicare a acestor soluții după cum este recomandat de producătorul lizatului (volumul soluției-test și soluției de lizat, raportul volumelor de soluție-test și soluție de lizat, timpul de incubare, etc.).

### **PREPARAȚI SOLUȚIILE A, B, C ȘI D**

Tabelul 19

Soluția	Concentrația de endotoxină	Soluția la care este adăugată endotoxina	Numărul de replicare
A	Nici una	Soluție-test	Nu mai mic de 2
B	Concentrația medie a curbei standard	Soluție-test	Nu mai mic de 2

C	Cel puțin 3 concentrații (concentrația cea mai mică este $\lambda$ )	Apă pentru TEB	Fiece concentrație nu mai mică de 2
D	Nici una	Apă pentru TEB	Nu mai mic de 2

**Soluția A** = soluție-test care poate fi diluată fără a depăși DMV.

**Soluția B** = compoziția, care urmează a fi examinată la aceeași diluție ca soluția A, conținând endotoxină adăugată de o concentrație din mijlocul curbei standard de endotoxină,

**Soluția C** = soluție standard de endotoxină în concentrații folosite la validarea metodei după cum este descris în p.3. Pregătirea pentru testare (i) Asigurarea criteriilor curbei standard (soluție de control cu rezultat pozitiv)

**Soluția D** = apă pentru TEB (soluție de control cu rezultat negativ).

Calculați recuperarea medie a endotoxinei adăugate, prin minusarea concentrației medii de endotoxină în soluție (dacă există) din cea a soluției ce conține endotoxină adăugată.

Soluția-test este considerată a nu avea factori de interferență dacă în condițiile testului concentrația măsurată a endotoxinei adăugate la soluția-test este de 50-200 % din concentrația cunoscută de endotoxină adăugată, după extragerea oricărei endotoxine detectate în soluție fără adăugare de endotoxină. Dacă recuperarea endotoxinei este în afara diapazoanelor specificate, factorii de interferență trebuie înlăturați după cum este descris în secțiunea Tehnica de gelație, p.1. Pregătirea pentru testare (ii) Testul la factori de interferență. Eficiența tratamentului este verificată prin repetarea testului la factori de interferență.

## TESTAREA

### Procedura

Urmați procedura descrisă în p.3. Pregătirea pentru testare, (ii) Testul la factori de interferență.

### Calculul

Calculați concentrația de endotoxină a fiecărui replicat a soluției A, folosind curba standard creată de seriile de soluții de control cu rezultat pozitiv, soluția C. Testul nu este valabil fără ca să fie îndeplinite următoarele trei condiții:

- (a) rezultatul obținut cu soluția D (soluție de control cu rezultat negativ) nu depășește limita valorii de referință, specificată în descrierea lizatului folosit,
- (b) rezultatele obținute cu seriile de soluții de control cu rezultat pozitiv, soluția C corespund cerințelor de validare, definite în p.3. Pregătirea pentru testare, Asigurarea criteriilor curbei standard,
- (c) recuperarea endotoxinei, calculată ca diferența dintre concentrația de endotoxină în soluția B și concentrația de endotoxină în soluția A, este în diapazonul de 50-200 %.

### Interpretarea

Compoziția examinată satisface condițiile testului dacă concentrația medie de endotoxină a replicatelor soluției A, după corectarea diluției și concentrației, este mai mică de limita de endotoxină pentru acest produs.

## 5. REAGENȚI

## **Soluție de lizat**

Dizolvați prin amestecare ușoară lizatul de amibocit în apă pentru TEB sau într-un bufer, după cum este recomandat de producătorul lizatului. Păstrați lizatul reconstituit, la rece sau la gheață, după cum este indicat de producător.

## **Lizat de amibocit**

Lizatul de amibocit este un produs liofilizat, obținut din lizat de amibocit din crevete (*Limulus polyphemus* sau *Tachypleus trideniatus*). Această denumire de reagent se referă doar la produsul, fabricat în conformitate cu regulamentele autorităților competente. În afară de endotoxine, lizatul de amibocit intră în reacție cu unele  $\beta$ -glucane. Sunt disponibile și compoziții de Lizat de amibocit, care nu intră în reacție cu glucanele; ele se prepară prin înlăturarea din lizatul de amibocit a factorului G, care intră în reacție cu glucanele, sau prin inhibarea sistemului de reacție a factorului G al lizatului de amibocit. Aceste compoziții pot fi folosite la testarea endotoxinelor în prezența glucanelor.

**Apă pentru TEB** (apă pentru testarea la endotoxinele bacteriene).

Apa pentru TEB este apă pentru injecții R sau apă, obținută prin alte metode, care nu intră în reacție cu lizatul folosit la limita de detectare de reagent. Următoarele despărțituri sunt publicate pentru informație.

## **2.2. TESTAREA ENDOTOXINELOR BACTERIENE**

Endotoxinele bacteriilor gram-negative sunt cele mai frecventăcauze a reacțiilor toxice, care rezultă din contaminarea produselor farmaceutice cu pirogeni; activitatea lor pirogenică este mult mai înaltă decât cea a majorității altor substanțe pirogene. Aceste endotoxine reprezintă niște lipopolizaharide. Deși există un număr mic de pirogeni de altă structură, în general este justificată concluzia că absența endotoxinelor bacteriene într-un produs presupune absența componentelor pirogene, și că prezența substanțelor pirogene provenite din non-endotoxine poate fi exclusă. Prezența endotoxinelor într-un produs poate fi mascată de factorii care interferează cu reacția dintre endotoxine și lizatul de amibocit. Deaceea, dacă cel ce face analiza dorește să înlocuiască testul la pirogeni pe iepuri, cerut de farmacopee, printr-un test la endotoxinele bacteriene, el trebuie să demonstreze că este posibil de efectuat o testare valabilă a produsului respectiv; aceasta poate presupune o procedură de înlăturare a factorilor de interferență.

După cum este indicat în testul la endotoxinele bacteriene, înainte ca testul unei probe să poată fi calificat drept valabil, trebuie să dispuneți de informație despre următoarele două aspecte

1.1 Trebuie să se stabilească corespunderea materialului care urmează a fi folosit pentru test cerințelor respective. Încredințați-vă de absența endotoxinelor în apa pentru TEB și în alți reagenți și verificați ca sensibilitatea lizatului de amibocit să corespundă sensibilității indicate de producător.

1.2 Deoarece produsul care urmează a fi examinat poate interfera cu testul, sensibilitatea lizatului de amibocit este determinată în prezența și în absența produsului supus examinării. Nu trebuie să fie o diferență semnificativă între cele două valori de sensibilitate.

Testul la endotoxinele bacteriene (2.6.14) indică metodele de înlăturare a factorilor de interferență; în caz de interferență, după aplicarea unei asemenea metode se va efectua un alt test pentru a verifica dacă interferența a fost cu adevărat neutralizată sau înlăturată.

Această anexă explică motivele de existență a unor anumite cerințe pentru testul la endotoxinele bacteriene, apoi abordează aspectele de apreciere și interpretare a rezultatelor.

Substituția testului la pirogeni pe iepuri, indicat de farmacopee, printr-un test cu lizat de amibocit presupune folosirea unei metode alternative de analiză și prin urmare necesită validare.

Metoda de referință pentru endotoxinele bacteriene este indicată în monografia fiecărui produs în parte; dacă nu este indicată nici o metodă, drept metodă de referință se va folosi metoda A. Dacă urmează a fi folosite alte metode decât cea de referință, cel ce face analiza trebuie să demonstreze că metoda este adecvată acestui produs și că rezultatul este comparabil cu cel obținut prin metoda de referință.

### **Metoda**

Adăugarea endotoxinelor la lizatul de amibocit poate rezulta în opalescență, precipitare sau gelație (închegare); doar metoda de gelație a fost folosită în Farmacopee drept criteriu de evaluare în primul tip de testare la endotoxinele bacteriene. Avantajul a fost simplitatea de argumentare a deciziei de apreciere a produsului prin examinarea absenței sau prezenței gelației, vizibile cu ochiul liber. Metodele cantitative, descrise ca metodele C, D, E și F au fost elaborate mai târziu: ele necesită mai mult instrumentar, dar sunt mai ușor de implementat pentru testarea în permanență a unui număr mare de probe ale aceluiași produs. Endotoxinele pot fi adsorbite pe suprafața vaselor sau pipetelor, confecționate din anumite tipuri de plastic sau sticlă. Interferența poate apărea datorită eliberării substanțelor din materialele plastice. Prin urmare, materialele folosite trebuie verificate; partidele diferite de vase sau pipete pot avea compoziție ușor diferită, și de aceea laborantul trebuie să repete asemenea teste înainte de a începe o nouă partidă de materiale.

Decizia de a folosi testul la endotoxinele bacteriene drept test limită presupune, în primul rând, aprecierea concentrației inițiale de endotoxină în produsul care urmează a fi testat și în al doilea rând, că scopul testului este de a afla dacă concentrația de endotoxină în produsul examinat este mai mică sau mai mare decât cea inițială. Metodele cantitative C, D, E și F oferă posibilitatea de a determina concentrația de endotoxină în proba examinată, dar pentru a fi compliante cu Farmacopeea și în controlul de rutină a calității înrebarea finală este dacă această concentrație depășește sau nu o anumită limită.

La stabilirea concentrației inițiale de endotoxină pentru produsul care urmează a fi testat, o atenție deosebită trebuie să se acorde cantității produsului: concentrația inițială trebuie să fie stabilită astfel, încât să se asigure faptul că atâta timp cât concentrația de endotoxină în produs va rămâne mai joasă de cea inițială, chiar administrată în doză maximă per oră pe o anumită cale, produsul nu va conține suficientă endotoxină pentru a cauza o reacție toxică. Atunci când concentrația de endotoxină în produs este egală exact cu valoarea inițială, gelația se va produce, la fel ca și în cazul când concentrația de endotoxină este mult mai mare, iar produsul nu va trece testarea, deoarece caracterul de apreciere a testului "toate-sau-nici

una” îl face incapabil de a diferenția dintre o concentrație egală exact cu concentrația inițială și una care este mai mare. Doar în cazul când gelația nu se produce, laborantul poate conchide, că concentrația de endotoxină este mai mică de concentrația inițială.

Deoarece testul poate fi efectuat doar pe soluții, pentru produsele în stare solidă, concentrația inițială de endotoxină per unitate de masă sau per Unitate Internațională (UI) a produsului, urmează a fi transformată în concentrație de endotoxină per mililitru de soluție care urmează a fi testată. Substanțele, care deja există în stare lichidă (cum ar fi lichidele pentru infuzii) sunt discutate mai jos.

*Limita de endotoxină:* limita de endotoxină pentru substanțe active administrate parenteral, apreciată în baza dozei, este egală , unde:

K

M

- K = doza pirogenă inițială de endotoxină per kilogram masă corp într-o perioadă de o singură oră,
- M = doza maximă recomandată a produsului per kilogram masă corp într-o perioadă de o singură oră.

Limita de endotoxină depinde de produs și calea lui de administrare și este indicată în monografiile. Valorile pentru K sunt sugerate în tabelul 20.

#### LIMITA DE ENDOTOXINĂ ÎN DEPENDENȚĂ DE PRODUS ȘI CALEA LUI DE ADMINISTRARE

Tabelul 20

Calea de administrare	K(UI) de endotoxină/kg masă corp /oră
Intravenos	5.0
Intravenos, pentru substanțe radiofarmaceutice	2.5
Intratecal	0.2

Care diluție a produsului trebuie folosită în test pentru a obține o siguranță maximă, că rezultatul negativ semnifică o concentrație de endotoxină în produs mai mică de limita de endotoxină și că rezultatul pozitiv semnifică detectarea unei concentrații de endotoxină egale sau mai mari de limita de endotoxină? Această diluție depinde de limita de endotoxină și de sensibilitatea lizatului: ea se numește Diluția maximă valabilă (DMV), iar valoarea ei poate fi calculată în felul următor:

$$MDV = \frac{\text{limita de endotoxină} \times \text{concentrația soluției-test}}{\lambda}$$

*Concentrația soluției-test:*

- în mg/ml dacă limita de endotoxină este exprimată prin masă (UI/mg).
- în Unități/ml dacă limita de endotoxină este exprimată prin unități de activitate biologică (UI/Unitate),
- în ml/ml dacă limita de endotoxină este exprimată prin volum (UI/ml).

$\lambda$  = sensibilitatea lizatului marcat în tehnica de gelație (UI/ml) sau cel mai jos punct, folosit în curbele standard ale tehnicilor turbidimetrică sau cromogenă.

Dacă valoarea diluției maxime valabile nu este un număr întreg, în scopuri practice poate fi folosit un număr potrivit întreg, mai mic de DMV (ceea ce înseamnă că se va prepara o soluție de produs mai puțin diluată decât DMV). În acest caz, un rezultat negativ indică că concentrația de endotoxină din produs este mai mică de valoarea limită. Totuși, atunci când concentrația de endotoxină din produs într-un asemenea test este mai mică de limita de endotoxină, dar suficient de înaltă pentru a intra în reacție cu lizatul, formând un cheag, testul poate fi considerat pozitiv în aceste condiții. Prin urmare, atunci când un test cu acest factor de diluție "potrivit" este pozitiv, produsul trebuie să fie diluat la DMV și testul trebuie să fie repetat. În caz de oricare îndoieli, se va folosi DMV.

Aceasta scoate în evidență importanța confirmării sensibilității lizatului.

### **Exemplu**

Este necesar a testa o soluție de 50 mg/ml de fenitoină de sodiu (destinată pentru injecții intravenoase). Determinați DMV, având următoarele variabile:

M = doza umană maximă = 15 mg per kilogram masă corp per oră,

c = 50 mg/ml,

K = 5 UI de endotoxină per kilogram masă corp per oră,

$\lambda$  = 0.4 UI de endotoxină per mililitru.

$$MDV = \frac{5 \times 50}{15} \times \frac{1}{0.4} = 41.6$$

Pentru testarea de rutină a acestui produs, s-ar putea să fie mai practic a dilua 1 ml de soluție care urmează a fi testată până la 20 ml (DMV/ 2 rotunjită până la numărul întreg mai mic). Totuși, dacă rezultatul acestui test este pozitiv, laborantul va trebui să dilueze 1 ml până la 41.67 ml și să repete testul. Dacă testul este efectuat în scop de a destrăma careva îndoieli, este de asemenea necesară o diluție până la 41.67 ml.

### **Materialul de referință**

*Standardul de Endotoxină BRP* este destinat pentru a fi folosit drept compoziție de referință. El a fost comparat cu Standardul Internațional de Endotoxină al OMS și potența lui este exprimată în Unități Internaționale de endotoxină per ampulă. Unitatea Internațională de endotoxină este definită ca activitatea specifică a unei anumite mase a Standardului Internațional. Pentru testări de rutină, poate fi folosită și o altă compoziție de endotoxină, cu condiția că aceasta a fost comparată cu Standardul Internațional de Endotoxină sau BRP, iar potența ei este exprimată în Unități Internaționale de endotoxină.

*NOTĂ:* o Unitate Internațională (UI) de endotoxină este egală cu o Unitate de Endotoxină (U.E.).

### **Apă pentru TEB**

Testarea absenței de endotoxine în acest reagent printr-o tehnică derivată din testul cu pirogeni pe iepuri a fost respins din motive practice și teoretice:

- 4.1. Testul pe iepuri nu este suficient de sensibil pentru detectarea endotoxinei în apa pentru TEB, destinată pentru testarea produselor cu o limită foarte joasă de endotoxină;
- 4.2. Precizia relativ joasă a răspunsului febril la iepuri va necesita multe replicații la iepuri;
- 4.3. Terminii "pirogeni" și "endotoxine" denotă grupuri de entități care nu coincid completamente.

Materialele informative despre testul la endotoxinele bacteriene indică, că pentru a prepara apă pentru TEB pot fi folosite și alte metode decât distilarea triplă. Osmoza inversă a fost folosită cu rezultate bune; unii laboranți pot prefera să distileze apa mai mult de trei ori. Oricare ar fi metoda folosită, produsul rezultat trebuie să nu conțină endotoxine detectabile.

### **pH-ul amestecului**

În testul la endotoxine bacteriene, gelația optimă se produce într-un amestec cu un pH de 6.0 - 8.0. Totuși, adăugarea lizatului la probă poate rezulta în micșorarea pH-ului.

### **Validarea lizatului**

La prepararea soluțiilor de lizat este important a urma instrucțiunile producătorului.

Factorii pozitivi ai punctului final de diluție în metodele de gelație A și B sunt transformați în logaritmi. Motivul este că în caz de reprezentare grafică a frecvenței de distribuție a acestor valori logaritmice, aceasta de obicei se aseamănă mult mai mult cu curba normală de distribuție decât frecvența de distribuție a factorilor de diluție în sine; de fapt, ea este atât de similară, încât este acceptabil a folosi distribuția normală a frecvenței drept model matematic și a calcula limitele de referință prin *t*-testul Student.

### **Testul preliminar la factori de interferență**

Unele produse nu pot fi testate la prezența de endotoxine în mod direct deoarece nu se amestecă cu reagenții, nu pot fi ajustate la un pH 6.0 - 8.0 sau inhibă ori activează formarea de gel. De aceea, pentru a verifica prezența factorilor de interferență, este necesar a efectua un test preliminar: la depistarea acestora laborantul trebuie să demonstreze că procedura de înlăturare a lor a fost efectivă.

Scopul testului preliminar este de a testa ipoteza nulă, care spune că sensibilitatea lizatului în prezența produselor examinate nu diferă semnificativ de sensibilitatea lizatului în absența acestuia. În metodele A și B se folosește un criteriu simplu: ipoteza nulă este acceptată dacă sensibilitatea lizatului în prezența produsului este de cel puțin 0.5 și nu mai mare de dublul sensibilității lizatului în sine.

Abordarea clasică este de a calcula mediile factorului de diluție logaritmat pentru sensibilitatea lizatului cu și fără produs și de a testa diferența dintre cele două medii prin *t*-testul Student.

Testul la factori de interferență în metodele de gelație A și B necesită folosirea unei probe de produs în care endotoxinele nu sunt detectabile. Aceasta reprezintă o problemă teoretică în caz că urmează a fi testat un produs totalmente nou. Prin urmare, pentru metodele cantitative C, D, E și F a fost elaborată o abordare diferită.

### **Înlăturarea factorilor de interferență**

Procedurile de înlăturare a factorilor de interferență nu trebuie să mărească sau să micșoreze (de exemplu, prin adsorbție) cantitatea de endotoxină în produsul examinat. Modul corect de a verifica acest

lucru este de a aplica procedurile date unei probe contaminate de produs, adică unei probe, la care s-a adăugat o cantitate cunoscută de endotoxină, cu măsurarea ulterioară a recuperării endotoxinei.

*Metodele C și D.* Dacă natura produsului, care urmează a fi analizat, posedă interferență, care nu poate fi înlăturată prin metode clasice, s-ar putea să fie posibil a crea o curbă standard pentru un produs similar, eliberat de endotoxine prin tratament corespunzător sau prin diluția produsului. Apoi se efectuează testul la endotoxine prin comparație cu această curbă standard.

S-a dovedit, că pentru majoritatea cazurilor se potrivește ultrafiltrarea prin filtre cu membrană asimetrică din triacetat de celuloză. Filtrele trebuie să fie validate în mod corespunzător, deoarece în unele circumstanțe derivații celulozei ( $\beta$ -D-glucozani) pot cauza rezultate fals pozitive. Filtrele din polisulfon nu sunt adecvate deoarece unii utilizatori au obținut rezultate fals pozitive.

#### **Scopul verificărilor**

Scopul verificărilor, efectuate cu apă pentru TEB și cu compoziția de referință de endotoxină la o concentrație dublă a sensibilității lizatului marcat, este de a verifica activitatea lizatului în timpul și în condițiile testului respectiv. Scopul reacției cu soluție de control cu rezultat negativ este de a verifica absența unei concentrații detectabile de endotoxină în apă pentru TEB.

Soluția de control cu rezultat pozitiv, care conține produsul ce urmează a fi examinat la concentrația folosită în test, este destinată pentru a demonstra absența factorilor inhibitori în timpul și în condițiile testului respectiv.

#### **Aprecierea și interpretarea rezultatelor**

Cantitățile mici de endotoxină în apa pentru TEB, sau în oricare alt reagent sau material, la care în timpul testului este expus lizatul, pot să nu se detecteze atâta timp, cât ele nu ating limita de sensibilitate a lizatului. Totuși, ele pot spori cantitatea de endotoxină din soluția ce conține produsul examinat la valori care depășesc limita de sensibilitate, determinând o reacție pozitivă.

Riscul că aceasta se poate întâmpla poate fi redus prin testarea apei pentru TEB și a altor reagenți și materiale cu cel mai sensibil lizat disponibil, sau cel puțin cu unul care este mai sensibil decât cel folosit la testarea produsului. Chiar și așa, riscul de a obține un asemenea "rezultat fals pozitiv" nu poate fi complet eliminat. Trebuie, totuși, de constatat că din acest punct de vedere design-ul testului este "asigurat de nereușită" în comparație cu un test, ce permite un rezultat fals negativ, fapt care ar putea duce la admiterea unui produs nesatisfăcător, punând prin acesta în primejdie sănătatea pacientului.

#### **Înlocuirea testului cu pirogen pe iepuri printr-un test la endotoxine bacteriene**

Monografiile privitoare la produsele farmaceutice pentru uz parenteral, care pot conține cantități toxice de endotoxine bacteriene, prevăd că acestea necesită a fi testate la endotoxine bacteriene sau printr-un test pirogen pe iepuri.

Politica generală:

- În oricare monografie individuală, atunci când este nevoie de un test, doar un test este inclus, fie cel la pirogeni, fie cel la endotoxinele bacteriene.
- În absența unor indicații contrare, testul la endotoxinele bacteriene se va prefera testului la pirogeni, deoarece de obicei se consideră că el asigură pacientului o protecție egală sau mai mare.



- Înainte de a include un test la endotoxinele bacteriene în monografie, este necesar a aduce evidențe că unul din testele descrise în capitolul 2.6.14 poate fi aplicat cu rezultate satisfăcătoare asupra produsului în cauză.
- Informația necesară este obținută de la producători. Companiile sunt rugate să ofere oricare date de validare, de care dispun, privitor la aplicabilitatea testului la endotoxine bacteriene asupra substanțelor și compozițiilor care prezintă interes. Aceste date includ detalii despre prepararea probei și a oricăror proceduri necesare pentru a elimina factorii de interferență. În plus, se vor oferi oricare date paralele disponibile despre testul cu pirogeni pe iepuri, fapt care va contribui la asigurarea faptului, că înlocuirea testului cu pirogeni pe iepuri prin testul la endotoxine bacteriene este adecvată.

Cerințele suplimentare sunt definite în următoarele despărțituri.

### **Folosirea unui test la endotoxine bacteriene diferit de cel prevăzut în monografie**

În caz că monografia prescrie efectuarea unui test la endotoxine bacteriene, dar nu specifică nici una din cele șase metode (A - F) descrise în capitolul 2.6.14, asta înseamnă că pentru acest produs a fost validată metoda A, metoda de gelație: test limită. Dacă este specificată una din celelalte metode (B - F), aceasta este metoda care a fost validată pentru acest produs.

#### **Validarea metodelor alternative**

Înlocuirea unui test cu pirogeni pe iepuri prin testul la endotoxine bacteriene, ori înlocuirea unei metode stabilite sau implementate la endotoxinele bacteriene prin altă metodă, trebuie calificată drept folosire a unei metode alternative în înlocuirea unui test farmaceutic, după cum este descris în Notițele Generale:

**"Testul și analizele descrise sunt metode oficiale, pe care se bazează standardele Farmaceutice. În scopuri de verificare, cu acordul autorităților competente, pot fi folosite metode alternative de analiză, asigurând faptul, că metodele folosite permit luarea unei decizii univoce, asemănătoare celei, care ar fi fost luată în complianță cu standardele monografiilor la folosirea metodelor oficiale. În caz de îndoieli sau dispute, unicele metode de referință de analiză sunt cele din Farmaceutice."**

Pentru validarea unei alte metode la endotoxine bacteriene decât cea prescrisă sau indicată în monografie sunt sugerate următoarele proceduri.

**Procedura, materialele și reagenții**, folosite în metodă trebuie să fie validate după cum este descris în testul respectiv.

**Prezența factorilor de interferență** (și, dacă este necesar, procedura de înlăturare a lor) trebuie să fie testată pe probe din cel puțin trei partide de producție. Se va ține minte, că metodele D și E, care folosesc o peptidă cromogenică, necesită reagenți, ce nu sunt folosiți în metodele A, B, C și F, și prin urmare complianța metodelor A, B, C sau F cu cerințele pentru factorii de interferență nu pot fi extrapolate asupra metodei D sau metodei E fără testare suplimentară.

#### **Validarea testului la produse noi**

Procedurile descrise în p. 13.1 și 13.2 trebuie să fie aplicate tuturor produselor noi, destinate pentru uz parenteral, care urmează a fi testat la prezența de endotoxine bacteriene conform cerințelor Farmaceutice.

### **2.3. DETERMINAREA AGREGATELOR ȘI FRAGMENTELOR PRIN METODA GEL-FILTRĂRII**

Filtrarea în gel reprezintă o metodă de separare a preparatelor în fracții pe baza diferențelor de masă moleculară,

Preparatele de imunoglobuline sunt separate în coloana cromatografică cu Sephadex G-200, după care se apreciază conținutul procentual al următoarelor fracții: 1) polimeri, 2) dimeri, 3) monomeri, 4) fragmente F (ab)<sub>2</sub>, 5) fragmente F (ab).

### Modul de lucru

Într-o coloană 100 x 2,5cm cu Sephadex G-200 se introduc 1 - 3 ml soluție de imunoglobulină de 5 %. Diluarea preparatului până la concentrația de 5% se efectuează cu soluție tris-tampon (pH 8,0 - 8,2). Fraționarea preparatului durează 12 - 14 ore la viteza de eluție de 15 - 20 ml/oră. Volumul de lichid în fiecare eprubetă trebuie să fie de 5 - 9 ml.

Densitatea optică a conținutului fiecărei eprubete se apreciază cu un fotocolorimetru la lungimea de undă de 280 nm, folosind cuva cu drum optic de 10 mm.

Repartizarea fracțiilor proteice se reprezintă în mod grafic.

Conținutul eprubetelor se introduce în vase diferite, corespunzătoare fiecărei fracții a preparatului, se măsoară volumul acestuia și se apreciază densitatea optică.

În caz că valoarea densității optice depășește zona optimă de funcționare a dispozitivului, fracțiile preparatului se diluează. Densitatea optică sumară a fiecărei fracții a preparatului (E) se calculează cu ajutorul următoarei formule:

$$E = D_{280} \times V_x \times P_x$$

Unde

- $V_x$  – volumul fracției
- $D_{280}$  – densitatea optică a fracției
- $P_x$  – diluția fracției

Suma densității optice a tuturor fracțiilor preparatului constituie 100%. Se calculează conținutul procentual al fiecărei fracții în preparat față de suma obținută.

Pentru a determina consecutivitatea eluției fiecărei fracții a preparatului și a aprecia masa moleculară se efectuează calibrarea coloanei cu gel, folosind proteinele de calibrare: feritina (masa moleculară 440000), catalaza (masa moleculară 232000), aldolaza (masa moleculară 158000), ovalbumina (masa moleculară 43000). Volumul soluției de proteină standard, aplicată pe coloana de gel, trebuie să constituie 1-2% din volumul total al coloanei. Concentrația soluției preparate de feritină trebuie să fie de 1 mg/ml, iar concentrația soluțiilor preparate de catalază, aldolază și ovalbumină trebuie să fie de 5 - 10 mg/ml.

Se determină volumul eluat ( $V_e$ ) al fiecărei soluții de calibrare. Volumul total al coloanei cu gel ( $V_t$ ) se calculează cu ajutorul următoarei formule:  $V_t = \pi r^2 h$ , unde  $\pi = 3,14$ ;  $r = 1,25$  cm;  $h$  = înălțimea coloanei de gel.

Se calculează valoarea coeficientului de repartizare ( $C_d$ ) pentru fiecare proteină în parte, folosind următoarea formulă:

$$C_d = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

Unde

$V_e$  – volumul eluat al fracției soluției de calibrare în mililitri

$V_o$  – volumul în mililitri egal cu volumul eluat al fracției dextranului albastru

$V_t$  – volumul total al coloanei cu gel în mililitri

Se trasează graficul dependenței coeficientului de repartizare ( $C_d$ ) de logaritmul zecimal ( $\lg$ ) al masei moleculare a fiecărei soluții de calibrare.

Notă:

#### 1. Prepararea gelului de Sephadex G-200.

Într-un vas de sticlă se introduc 18 - 20 g de Sephadex G-200, se adaugă 800 ml -1l apă și se lasă timp de 3 zile la temperatura de 18-22°C pentru ca gelul să se umfle. După aceasta se efectuează decantarea lichidului de deasupra sedimentului. Se toarnă o nouă porție de apă, conținutul vasului se amestecă cu grijă, folosind o baghetă de sticlă, și se lasă să se sedimenteze gelul. Decantarea se efectuează până la momentul, când lichidul de deasupra sedimentului nu mai conține particule mărunte de gel, care ar putea obtura coloana. Se măsoară înălțimea coloanei de gel deplin sedimentat și se trasează un marcaj la un nivel, ce depășește nivelul gelului sedimentat cu jumătate din înălțimea coloanei de gel Sephadex G-200. Se îndepărtează lichidul de până la marcaj. Conținutul rămas se amestecă cu grijă, folosind o baghetă de sticlă, pentru a obține o suspensie omogenă, după care se toarnă în coloana cromatografică cu pâlnie.

#### 2. Prepararea gelului Sephadex G-25

Într-o eprubetă cu 8 – 10ml de apă se introduc 1,0 – 1,5g de Sephadex G-25 și se lasă timp de 3 - 3,5 ore la temperatura de 18-22°C pentru ca gelul să se umfle.

După aceasta procedura este aceeași ca la prepararea Sephadex G-200.

#### 3. Prepararea soluției tris-tampon (pH 8,0 – 8,2)

Într-un balon cotat cu capacitatea de 1l se introduc 200 - 300ml de apă, 6,06g tris-(oximetil)-aminometan și 58,5g de clorură de natriu. Se amestecă și se adaugă 275 ml soluție de acid clorhidric cu concentrația de 0,1 mmol/l. După dizolvarea reactivelor se completează la semn cu apă. Soluția tampon se filtrează și se păstrează la temperatura de 4 – 10°C.

#### 4. Umplerea coloanei

Coloana se fixează în poziție verticală și se închide robinetul de scurgere a coloanei, aflat în partea ei inferioară. În partea superioară a coloanei se introduce o pâlnie sau un rezervor cu adaptor. Toată suspensia omogenă preparată de gel Sephadex se toarnă în coloană, folosind o baghetă de sticlă. Se lasă în repaus pentru ca gelul să se sedimenteze până la formarea unui strat de gel cu grosimea de 5 - 10 cm, după care se deschide robinetul de scurgere a coloanei. Se umple continuu coloana până la atingerea de către stratul obținut a înălțimii de 75 – 95 cm. Se închide robinetul din partea inferioară a coloanei. Se

suprapune un strat de Sephadex G-25 cu înălțimea de 5 - 7 mm. La partea superioară a coloanei se conectează rezervorul cu soluție tampon, se deschide robinetul de scurgere a coloanei și se spală coloana cu volum dublu sau triplu de soluție tampon. Înălțimea rezervorului cu soluție tampon nu trebuie să se afle mai sus de 250-300 mm față de nivelul de ieșire a lichidului de eluție din coloană. În caz că aveți la dispoziție o pompă peristaltică, această condiție poate fi neglijată.

#### 5. Introducerea preparatului în coloană

Se îndepărtează lichidul de deasupra stratului de gel prin aspirare sau prin deschiderea robinetului de scurgere a coloanei. Cu ajutorul unei pipete se introduce proba de analizat astfel, încât ca ea să se dispună de asupra gelului, în acest timp robinetul de scurgere a coloanei trebuie să fie închis. Robinetul de scurgere a coloanei se unește la colectorul fracției respective sau la sistemul automat pentru gel-filtrare. Se deschide robinetul de scurgere a coloanei, se cuplează sistemul automat pentru gel-filtrare sau colectorul fracțiilor. Se lasă proba de analizat să pătrundă în gel. Se închide robinetul din partea inferioară a coloanei și se spală partea superioară a coloanei cu soluție tampon, dispunând-o cu grijă pe suprafața gelului în 2-3 rate a câte 4-5 ml. Operația de introducere a preparatului în coloană poate fi simplificată prin utilizarea adaptoarelor. În acest caz, cu ajutorul unei pompe peristaltice, substanța nimereste printr-un tub conector nemijlocit în coloană.

#### 6. Verificarea corectitudinii umplerii coloanei

Determinarea corectitudinii umplerii coloanei se efectuează folosind soluție proaspăt preparată de 0,2% de dextran albastru. 8-10 mg de dextran albastru (masa moleculară  $2 \times 10^6$ ) se dizolvă în 4-5 ml soluție tampon, se introduce în coloană și se efectuează gel-filtrarea după cum este descris mai sus. Calitatea umplerii coloanei se apreciază în baza reprezentării grafice a fracției dextranului albastru. Vârful fracției trebuie să înceapă sub un unghi de  $93 - 98^\circ$  și să se termine cu o linie dreaptă, în caz contrar coloana trebuie reumplută. Verificarea corectitudinii umplerii coloanei se efectuează la fiecare umplere nouă a coloanei.

#### 7. Determinarea volumului liber ( $V_o$ ) al coloanei

Volumul liber este egal cu volumul de lichid colectat din momentul introducerii substanței în coloană până la apariția vârfului fracției, corespunzător maximumului de eluție a dextranului albastru.

### 2.4. DETERMINAREA PARAMETRILOR MOLECULARI AI POLIZAHARIDELOR.

Parametrii moleculari ai polizaharidelor se apreciază prin metoda filtrării în gel în coloana cromatografică cu Sepharoză 4B. Conținutul de polizaharide în volumul de eluat de până la  $C_d = 0,5$  se apreciază procentual față de cantitatea totală de polizaharid, eluat din coloană. Metoda este recomandată pentru vaccinurile polizaharidice meningococice.

#### Modul de lucru

Într-o coloană cu dimensiunile de 90 x 1,5cm cu Sepharoză 4B se introduce 1 ml soluție de analizat (soluția de analizat se prepară folosind soluție tampon salină cu pH 7,4). Fraționarea preparatului se efectuează la viteza de 15 - 20 ml/oră, folosind pentru eluție soluție tampon salină. Se colectează fracții a câte 2 ml în fiecare eprubetă. Se calculează volumul eluat ( $V_e$ ) în mililitri al fiecărei fracții, corespunzător  $C_d = 0,5$ , folosind următoarea formulă:

$$V_e = V_o + 0,5 (V_t - V_o)$$

Unde

- 0,5 – coeficientului de repartizare ( $C_d$ ) a substanței în coloană

$V_o$  – volumul liber al coloanei în mililitri

$V_t$  – volumul total al coloanei cu gel în mililitri

Fracțiile eluatului se împart în două grupuri. Primul grup întrunește fracțiile, care corespund diapazonului de la  $V_o$  până la  $C_d$ . Al doilea grup întrunește fracțiile următoare, până la cea, care corespunde  $V_t$ . În fiecare din cele două grupuri se apreciază conținutul de fosfor, prelevând pentru analiză 1ml. Determinarea se efectuează folosind metoda descrisă în capitolul «Determinarea fosforului». Conținutul de fosfor în cele două grupuri constituie 100%. Conținutul procentual de polizaharide în volumul de eluat de până la  $C_d$  este egal cu conținutul fosforului în primul grup de fracții.

Unde

- $V_x$  – volumul fracției
- $D_{280}$  – densitatea optică a fracției
- $P_x$  – diluția fracției

Suma densității optice a tuturor fracțiilor preparatului constituie 100%. Se calculează conținutul procentual al fiecărei fracții în preparat față de suma obținută.

Pentru a determina consecutivitatea eluției fiecărei fracții a preparatului și a aprecia masa moleculară se efectuează calibrarea coloanei cu gel, folosind proteinele de calibrare: feritina (masa moleculară 440000), catalaza (masa moleculară 232000), aldolaza (masa moleculară 158000), ovalbumina (masa moleculară 43000). Volumul soluției de proteină standard, aplicată pe coloana de gel, trebuie să constituie 1-2% din volumul total al coloanei. Concentrația soluției preparate de feritină trebuie să fie de 1 mg/ml, iar concentrația soluțiilor preparate de catalază, aldolază și ovalbumină trebuie să fie de 5 - 10 mg/ml.

Se determină volumul eluat ( $V_e$ ) al fiecărei soluții de calibrare. Volumul total al coloanei cu gel ( $V_t$ ) se calculează cu ajutorul următoarei formule:  $V_t = \pi r^2 h$ , unde  $\pi = 3,14$ ;  $r = 1,25$  cm;  $h$  = înălțimea coloanei de gel.

Se calculează valoarea coeficientului de repartizare ( $C_d$ ) pentru fiecare proteină în parte, folosind următoarea formulă:

$$C_d = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

Unde

- $V_e$  – volumul eluat al fracției soluției de calibrare în mililitri
- $V_o$  – volumul în mililitri egal cu volumul eluat al fracției dextranului albastru
- $V_t$  – volumul total al coloanei cu gel în mililitri

Se trasează graficul dependenței coeficientului de repartizare ( $C_d$ ) de logaritmul zecimal ( $\lg$ ) al masei moleculare a fiecărei soluții de calibrare.

Notă:

3. Prepararea gelului de Sephadex G-200.

Într-un vas de sticlă se introduc 18 - 20 g de Sephadex G-200, se adaugă 800 ml -1l apă și se lasă timp de 3 zile la temperatura de 18-22°C pentru ca gelul să se umfle. După aceasta se efectuează decantarea lichidului de deasupra sedimentului. Se toarnă o nouă porție de apă, conținutul vasului se amestecă cu grijă, folosind o baghetă de sticlă, și se lasă să se sedimenteze gelul. Decantarea se efectuează până la momentul, când lichidul de deasupra sedimentului nu mai conține particule mărunte de gel, care ar putea obtura coloana. Se măsoară înălțimea coloanei de gel deplin sedimentat și se trasează un marcaj la un nivel, ce depășește nivelul gelului sedimentat cu jumătate din înălțimea coloanei de gel Sephadex G-200. Se îndepărtează lichidul de până la marcaj. Conținutul rămas se amestecă cu grijă, folosind o baghetă de sticlă, pentru a obține o suspensie omogenă, după care se toarnă în coloana cromatografică cu pâlnie.

4. Prepararea gelului Sephadex G-25

Într-o eprubetă cu 8 - 10ml de apă se introduc 1,0 - 1,5g de Sephadex G-25 și se lasă timp de 3 - 3,5 ore la temperatura de 18-22°C pentru ca gelul să se umfle.

După aceasta procedura este aceeași ca la prepararea Sephadex G-200.

5. Prepararea soluției tris-tampon (pH 8,0 - 8,2)

Într-un balon cotate cu capacitatea de 1l se introduc 200 - 300ml de apă, 6,06g tris-(oximetil)-aminometan și 58,5g de clorură de sodiu. Se amestecă și se adaugă 275 ml soluție de acid clorhidric cu concentrația de 0,1 mmol/l. După dizolvarea reactivelor se completează la semn cu apă. Soluția tampon se filtrează și se păstrează la temperatura de 4 - 10°C.

6. Umplerea coloanei

Coloana se fixează în poziție verticală și se închide robinetul de scurgere a coloanei, aflat în partea ei inferioară. În partea superioară a coloanei se introduce o pâlnie sau un rezervor cu adaptor. Toată suspensia omogenă preparată de gel Sephadex se toarnă în coloană, folosind o baghetă de sticlă. Se lasă în repaus pentru ca gelul să se sedimenteze până la formarea unui strat de gel cu grosimea de 5 - 10 cm, după care se deschide robinetul de scurgere a coloanei. Se umple continuu coloana până la atingerea de către stratul obținut a înălțimii de 75 - 95 cm. Se închide robinetul din partea inferioară a coloanei. Se suprapune un strat de Sephadex G-25 cu înălțimea de 5 - 7 mm. La partea superioară a coloanei se conectează rezervorul cu soluție tampon, se deschide robinetul de scurgere a coloanei și se spală coloana cu volum dublu sau triplu de soluție tampon. Înălțimea rezervorului cu soluție tampon nu trebuie să se afle mai sus de 250-300 mm față de nivelul de ieșire a lichidului de eluție din coloană. În caz că aveți la dispoziție o pompă peristaltică, această condiție poate fi neglijată.

7. Introducerea preparatului în coloană

Se îndepărtează lichidul de deasupra stratului de gel prin aspirare sau prin deschiderea robinetului de scurgere a coloanei. Cu ajutorul unei pipete se introduce proba de analizat astfel, încât ca ea să se dispună de asupra gelului, în acest timp robinetul de scurgere a coloanei trebuie să fie închis. Robinetul de scurgere a coloanei se unește la colectorul fracției respective sau la sistemul automat pentru gel-filtrare. Se deschide robinetul de scurgere a coloanei, se cuplează sistemul automat pentru gel-filtrare sau

colectorul fracțiilor. Se lasă proba de analizat să pătrundă în gel. Se închide robinetul din partea inferioară a coloanei și se spală partea superioară a coloanei cu soluție tampon, dispunând-o cu grijă pe suprafața gelului în 2-3 rate a câte 4-5 ml. Operația de introducere a preparatului în coloană poate fi simplificată prin utilizarea adaptoarelor. În acest caz, cu ajutorul unei pompe peristaltice, substanța nimereste printr-un tub conector nemijlocit în coloană.

#### 8. Verificarea corectitudinii umplerii coloanei

Determinarea corectitudinii umplerii coloanei se efectuează folosind soluție proaspăt preparată de 0,2% de dextran albastru. 8-10 mg de dextran albastru (masa moleculară  $2 \times 10^6$ ) se dizolvă în 4-5 ml soluție tampon, se introduce în coloană și se efectuează gel-filtrarea după cum este descris mai sus. Calitatea umplerii coloanei se apreciază în baza reprezentării grafice a fracției dextranului albastru. Vârful fracției trebuie să înceapă sub un unghi de  $93 - 98^\circ$  și să se termine cu o linie dreaptă, în caz contrar coloana trebuie reumplută. Verificarea corectitudinii umplerii coloanei se efectuează la fiecare umplere nouă a coloanei.

#### 9. Determinarea volumului liber ( $V_0$ ) al coloanei

Volumul liber este egal cu volumul de lichid colectat din momentul introducerii substanței în coloană până la apariția vârfului fracției, corespunzător maximumului de eluție a dextranului albastru.

### 3. METODELE DE CERCETARE A HEMOSTAZEI

#### 3.1. Determinarea activității factoriului VIII

Setul **Factor VIII-test** este destinat pentru determinarea cantitativă a activității f. VIII în plasma sangvină umană conform metodei standard monostadiale în scop de diagnosticare a hemofiliei A și pentru monitorizarea tratamentului de substituție cu preparate din plasmă în hemofilie A.

##### Principiul metodei

Metoda monostadială se bazează pe dependența lineară dintre activitatea f. VIII și timpul de coagulare în testul timpului de tromboplastină parțială activată (PTTa).

Considerând faptul, că activitatea f. VIII în plasma normală este foarte înaltă, s-a hotărât a lua drept activitate de 100% activitatea plasmelor normale, diluate de 5 ori. Pentru micșorarea ulterioară artificială a activității plasma normală se diluează încă de 10, 50 și 250 ori și în soluțiile diluate se determină PTTa. Pentru suplinirea factorilor de coagulare, concentrațiile cărora scad la diluare, se adaugă plasma bolnavilor cu hemofilie, în care practic lipsește (sub 2%) doar f. VIII, iar ceilalți factori sunt prezenți în concentrații normale.

Curba de calibrare se trasează, apreciind PTTa în aceste soluții diluate de plasmă normală martor cu activitate cunoscută a f. VIII (conform plasmelor standard de import). Plasma de cercetat se diluează (de 5, 10 și 50 ori) în mod similar. În soluțiile diluate ale plasmelor de cercetat de asemenea se determină PTTa și prin 3 puncte se trasează a doua curbă, care trebuie să reprezinte o linie dreaptă, paralelă cu curba de calibrare. În caz că cele două curbe sunt paralele determinarea ulterioară poate fi efectuată în baza unui singur punct. Metoda se bazează pe principiile internaționale de standardizare a investigațiilor coagulologice, descrise anterior.

Drept unitate de activitate biologică a f. VIII este considerată activitatea, prezentă în 1,0 ml de plasmă normală proaspătă.

Activitatea f. VIII poate fi exprimată atât în unități internaționale (UI/ml) de activitate, cât și în % din normă. (activitatea de 100% f. VIII = 1 UI). Descrierea detaliată a metodei este prezentată mai jos.

### Componența setului

- erolidă uscată prin liofilizare (analog al cefalinei) - 1 fl.;
- suspensie de caolină în soluție de clorură de sodiu 0,9% - 1 fl. (5 ml);
- soluție de clorură de calciu 0,025 M - 1 fl. (5 ml);
- plasmă din substrat uscată prin liofilizare (activitatea f. VIII sub 2 %) - 5 fl.;
- plasmă martor cu activitate cunoscută a f. VIII uscată prin liofilizare - 1 fl.;
- concentrat de tampon imidazolic - 1 fl. (5 ml).

### PREPARAREA REAGENȚILOR

#### Prepararea plasmei din substrat

Într-un flacon cu plasmă din substrat introduceți 1,0 ml de apă distilată și dizolvați conținutul prin rotire. A se folosi pentru investigații doar timp de 2 ore după preparare. În timpul testării eprubeta cu soluție de plasmă din substrat se va ține într-un pahar cu gheață topindă.

#### Prepararea soluției de lucru de erolidă

Agitați energic suspensia de caolină și turnați-o într-un flacon cu erolidă. Înainte de efectuarea examinării lăsați soluția obținută de lucru de erolidă timp de 30 min la temperatura camerei (+ 18-25°C). Soluția de lucru de erolidă poate fi reutilizată (timp de 2 săptămâni) cu condiția de păstrare la temperatura de + 2 - 8°C, însă de fiecare dată la reutilizarea soluției de lucru de erolidă trebuie să trasați o curbă nouă de calibrare.

#### Prepararea tamponului imidazolic

Turnați întreg conținutul flaconului cu concentrat de tampon imidazolic într-un balon cotate cu capacitatea de 100 ml, aduceți la semn cu apă distilată și amestecați prin răsturnare. pH-ul soluției tampon obținute este egal cu  $7,35 \pm 0,1$ . Soluția tampon poate fi păstrată la temperatura de + 2-8°C nu mai mult de 20 zile după preparare.

#### Prepararea plasmei martor

Introduceți într-un flacon cu plasmă martor uscată prin liofilizare 1,0 ml de apă distilată și dizolvați conținutul prin rotire. Peste 15 min după dizolvare plasma este gata pentru utilizare. Soluția de plasmă martor poate fi folosită doar timp de 2 ore după preparare, și păstrată la temperatura camerei + 18-25°C. La trasarea curbei de calibrare plasma martor se diluează cu soluție tampon, și soluțiile obținute se admite a fi păstrate nu mai mult de 30 min din momentul de preparare.

#### Obținerea plasmei pentru analize

Într-o eprubetă cotate se amestecă 9 părți de sânge venos proaspăt recoltat cu 1 parte de soluție de citrat de sodiu 0,11 M, sângele citratat obținut se centrifugează imediat la temperatura camerei (+ 18 - 25°C) timp de 10 minute la 3000 turații/min, după care plasma se transferă imediat într-o eprubetă de plastic sau de sticlă siliconată. Plasma se va folosi pentru analize doar timp de 2 ore după recoltarea sângelui.

#### Trasarea curbei de calibrare

Determinarea cantitativă a activității f. VIII în plasma de cercetat se va efectua conform curbei de calibrare a dependenței activității f. VIII în % de durata PTTa în secunde. Pentru trasarea curbei de calibrare diluați plasma martor cu valoare cunoscută a activității f. VIII de 5, 10, 50, 250 ori cu soluție tampon imidazolic. Modalitatea de diluție este indicată în tabelul următor:

Diluția	de 5 ori	de 10 ori	de 50 ori	de 250 ori
---------	----------	-----------	-----------	------------



Activitatea f. VIII în % (axa X)	100	50	10	2
Activitatea f. VIII în UI/ml (axa X)	1,0	0,5	0,1	0,02
Tampon, ml	1,6	0,5	0,9	0,8
Plasmă martor, ml	0,4	-	-	-
Amestecați și transferați în altă eprubetă. ml	0,1 0,5	↑	0,2	↑

În toate soluțiile diluate de plasmă martor determinați PTTa, folosind următoarea metodă:

1. Încălziți soluția de clorură de calciu la temperatura de + 37°C (3 min).
2. Introduceți în 4 eprubete:
  - câte 0,1 ml plasmă martor, diluată de 5, 10, 50 sau 250 ori cu tampon imidazolic;
  - câte 0,1 ml plasmă din substrat;
  - câte 0,1 ml soluție de lucru de erolidă.
3. Amestecați conținutul eprubetelor prin rotire și încălziți timp de 5 min la temperatura de +37°C.
4. Introduceți în aceleași eprubete câte 0,1 ml de soluție încălzită (+37°C) de clorură de calciu, amestecați prin rotire și determinați timpul de coagulare în fiecare din soluția diluată a plasmei de cercetat din momentul adăugării soluției de clorură de calciu.

Depuneți pe hârtia semilogaritmică (întră în componența setului):

- pe axa lineară verticală a ordonatelor (Y) - durata PTTa pentru fiecare soluție diluată de plasmă martor, în secunde;
- pe axa logaritmică orizontală a absciselor (X) - activitatea f. VIII. În % (și în UI/ml), corespunzătoare diluției soluției respective de plasmă martor (scala logaritmică se folosește în scop de linealizare a curbelor).

La unirea punctelor depuse se formează o linie dreaptă a curbei de calibrare, conform căreia se determină activitatea plasmei de cercetat în %.

### Modul de lucru cu plasma de cercetat

Determinarea activității f. VIII cu ajutorul setului se efectuează prin metoda manuală sau folosind coagulometrele mecanice și optico-mecanice. Ambele metode se bazează pe înregistrarea timpului de coagulare a plasmei sangvine, însă la efectuarea metodei manuale cronometrarea timpului este vizuală, conform unui cronometru, iar amestecarea ingredientelor reacției cu plasma sangvină colectată pentru analiză se efectuează în eprubete, aflate în baie marină. La efectuarea metodei coagulometrice amestecarea reagenților și plasmei de analizat are loc în cuve speciale, incluse în set, iar termostatarea și cronometrarea timpului se efectuează automat. În ambele cazuri consecutivitatea efectuării reacției este aceeași:

1. Diluați plasma de cercetat de 5, 10 și 50 ori conform descrierii din tabel.
2. Încălziți soluția de clorură de calciu la temperatura de + 37°C (5 min).
3. Introduceți în 3 eprubete:
  - câte 0,1 ml plasmă de cercetat, diluată de 5, 10 sau în 50 ori cu tampon imidazolic;
  - câte 0,1 ml plasmă din substrat;
  - câte 0,1 ml soluție de lucru de erolidă.
4. Amestecați conținutul eprubetelor prin rotire și încălziți timp de 5 min la temperatura de +37°C.
5. Introduceți în aceleași eprubete câte 0,1 ml de soluție încălzită (+37°C) de clorură de calciu,

amestecați prin rotire și determinați timpul de coagulare în fiecare din soluția diluată a plasmei de cercetat din momentul adăugării soluției de clorură de calciu.

6. Trasați a doua curbă, depunând pe axa lineară verticală (Y) valoarea PTTa pentru fiecare soluție diluată de plasmă de cercetat, în secunde, iar pe axa logaritmică orizontală a absciselor (X) - activitatea f. VIII, corespunzătoare diluției soluției respective (vedeți tabelul). A doua curbă trebuie să fie dispusă anterior de curba de calibrare. Dacă ea este dispusă mai jos, vedeți p. 10.

7. Convingeți-vă de faptul, că cele două curbe sunt paralele. Lipsa paralelismului indică inexactitatea efectuării analizării, și analiza urmează a fi repetată.

8. Determinați activitatea f. VIII în plasma de cercetat, trasând din punctul, corespunzător diluției de 5 ori a plasmei de cercetat, o linie dreaptă, paralelă cu axa X, până la intersecția ei cu curba de calibrare. Din punctul de intersecție coborâți în jos o perpendiculară până la intersecția ei cu axa X, pe care sunt depuse valorile activității f. VIII, și astfel determinați activitatea plasmei de cercetat.

9. Efectuați recalcularea datelor în valorile activității reale a f. VIII în % și UI conform următoarele formule:

$$A = \frac{A_x \times A_k}{100}$$

unde:

A – valoarea exactă a activității f. VIII în plasma de cercetat, %;

$A_x$  – valoarea activității f. VIII în plasma de cercetat, % (diluția de 5 ori), obținută folosind curba de calibrare;

$A_k$  – activitatea cunoscută a f. VIII în plasma normală, %.

10. În caz că activitatea f. VIII în plasma de cercetat este înaltă, curba plasmei de cercetat se poate situa mai jos de curba de calibrare. În asemenea situații plasma de cercetat urmează a fi inițial diluată de 2 ori (1:1), după care se va efectua diluția ulterioară de 5, 10 și 50 ori în modul indicat în tabel, și analizarea, conform descrierii anterioare. La calculul datelor finale valoarea obținută a activității f. VIII urmează a fi înmulțită cu 2.

11. Pentru recalculul în unități de UI/ml valoarea obținută a activității f. VIII în % trebuie împărțită la 100.

### ***Interpretarea datelor obținute***

- Hemofilie gravă. Nivelul f. VIII sau IX este sub 1%. Hemartrozele, hemoragiile în mușchi și alte organe se produc la leziuni minime sau chiar neobservate.

- Hemofilie de gravitate medie. Nivelul f. VIII sau IX este cuprins între 1-5%. Hemoragiile apar la leziuni evidente neînsemnate, de asemenea după diferite tipuri de intervenții chirurgicale și extracții dentare.

- Hemofilie ușoară. Nivelul f. VIII sau IX este cuprins între 6-30%. Hemoragiile apar de obicei doar la leziuni masive, diferite tipuri de intervenții chirurgicale și extracții dentare. Diagnosticarea unei asemenea forme poate fi efectuată abia la vârstă adultă sau la apariția hemoragiilor în situațiile indicate mai sus.

### **Exemplu de determinare grafică a activității f. VIII**

Pentru a ilustra cele descrise mai sus aducem un exemplu de calcul grafic al activității f. VIII în plasma de cercetat. Pe desenul 3 sunt reprezentate curbele diluției plasmei martor (curba de calibrare) și plasmei de testat.

Pe axa orizontală logaritmică a absciselor (X) este depusă activitatea f. VIII în %, corespunzătoare diluției plasmei, iar pe axa lineară a ordonatelor (Y) - timpul de coagulare, în secunde. Linia inferioară

reprezintă curba de calibrare, trasată conform soluțiilor diluate de plasmă martor, iar linia superioară reprezintă curba, trasată conform soluțiilor diluate ale plasmei de cercetat. De asupra punctelor este indicată diluția plasmei, corespunzătoare activității f. VIII.

După cum urmează din desenul 3, cele două linii, adică curba de calibrare, trasată conform datelor duratei PTTa în soluțiile diluate de plasmă martor (normale) cu activitate cunoscută, și curba, trasată în rezultatul aprecierii PTTa în soluțiile diluate ale plasmei de cercetat, sunt paralele.

Valoarea cunoscută a activității f. VIII în plasma normală în cazul dat este egală cu 91%. Paralelismul celor două curbe a permis a efectua calculul activității f. VIII în plasma de cercetat conform curbei de calibrare. In exemplul dat pentru diluția de 5 ori - activitatea f. VIII în plasma de cercetat a fost de 15%.

Desenul 3. Curbele diluției plasmei martor (curba de calibrare) și plasmei de testat

Folosiți formula arătată mai sus pentru calculul valorii reale a activității f. VIII:

$$A_A = \frac{A_x \times A_K}{100} = \frac{15 \times 91}{100} = 0,136 \text{ UI/ml}$$

Cu condiția paralelismului liniilor curbei de calibrare și curbei plasmei de cercetat, calculul activității f. VIII poate fi efectuat în baza unui singur punct.

### Caracteristicile analitice ale setului

Activitatea f. VIII în plasma normală - 90-100 % sau 0,9-1,0 UI/ml.

Deviația admisibilă a activității f. VIII în plasma normală de la valorile cunoscute nu este mai mare de 10%. Coeficientul de variabilitate a rezultatelor determinate nu este mai mare de 10%. Variația admisibilă a rezultatelor la determinarea activității f. VIII în probele unice ale plasmei sangvine la utilizarea diferitor seturi din aceeași serie nu este mai mare de 10%.

Sensibilitatea determinată - 1,5%.

Linearitatea valorilor determinate ale activității f. VIII în plasma sangvină umană în diapazonul de diluții a plasmei martor de la 2 până la 100%.

Diapazonul valorilor determinate ale activității f. VIII variază de la 2 până la 200 %.

### Condițiile de păstrare și de utilizare.

Setul de reagenți se va păstra la temperatura de + 2-8°C pe durata întregii perioade de valabilitate a setului (1 an). Se admite păstrarea la temperatura de până la + 25°C timp de 10 zile. Congelarea nu se admite.

Soluția de erolidă în caolină poate fi păstrată la temperatura de +2-8°C nu mai mult de 2 săptămâni.

După deschiderea flacoanelor cu soluție de clorură de calciu aceasta poate fi folosită repetat cu condiția ermetizării suficiente a flacoanelor. Soluția de clorură de calciu care a fost încălzită la efectuarea testelor, nu se va utiliza repetat.

Plasma martor și plasma de cercetat se admite a fi folosite pentru analize doar timp de 2 ore după preparare, fiind păstrate pe durata întregii perioade la temperatura camerei. În timpul investigațiilor eprubetele cu plasmă din substrat trebuie ținute într-un pahar cu gheață topindă.

Soluția de tampon imidazolic poate fi păstrată la temperatura + 2-8°C nu mai mult de 20 zile.

Curba de calibrare este necesar a fi trasată concomitent cu efectuarea examinării plasmei pacientului. Un set este destinat pentru efectuarea a 45 determinări la consumul fiecărui reagent de 0,1 ml pentru o analiză.

Pentru a obține rezultate credibile este necesar a respecta cu strictețe instrucțiunile de utilizare.

### ***Recomandări pentru efectuarea testelor, care permit evitarea celor mai tipice greșeli***

- Pentru a obține rezultate credibile recomandăm a folosi pentru analize doar plasmă comercializată atestată cu substrat definit, deoarece în plasmă neatestată poate fi o modificare semnificativă a activității factorilor V și VIII de coagulare a sângelui, determinată de prezența inhibitorilor.
- Curba de calibrare este necesar a fi trasată doar în ziua efectuării analizelor.
- Pentru a obține rezultate credibile se recomandă a investiga nu mai puțin de două diluții ale plasmei de cercetat.

### **Determinarea activității factorului VIII de coagulare a sângelui în crioprecipitat**

Prima informație despre faptul, că sedimentul proteinelor plasmei sangvine, care au căzut în precipitat la rece (- 60°C), conține 56% din activitatea inițială a f. VIII a apărut în anul 1959, și, deja în anul 1964, s-a instituit utilizarea practică a crioprecipitatului pentru tratamentul hemofiliei.

Pe lângă f. VIII, crioprecipitatul mai conține și alte componente: fibrinogen, fibronectină, factorul Willebrand, f. XIII și alte proteine (imunoglobuline,  $\alpha$  2-macroglobulină, factorii de coagulare II, VII, X).

Activitatea f. VIII în crioprecipitat variază de la 80 până la 150 UI, conținutul celorlalte componente este de asemenea diferit, fapt care îngreunează efectuarea analizei.

Studierea activității f. VIII în crioprecipitat se efectuează prin metoda monostadială, descrisă anterior, însă la aplicarea metodei pentru crioprecipitat există un șir de particularități.

### ***Particularitățile studierii activității f. VIII în crioprecipitat***

Pentru analiza crioprecipitatului nu există nici un standard corespunzător, și de aceea studierea crioprecipitatului se efectuează de obicei, folosind în calitate de standard Standardul Internațional pentru f. VIII sau plasma, atestată la f. VIII.

Pentru a obține rezultate credibile este necesar a respecta cu strictețe următoarele reguli:

- Diluarea plasmei martor și crioprecipitatului folosind tamponul imidazolic este necesar a efectua concomitent;
- Se va respecta cu strictețe consecutivitatea investigațiilor: fiecă diluție a plasmei martor este necesar a analiza concomitent cu diluția corespunzătoare a crioprecipitatului;
- Diluarea plasmei martor și a crioprecipitatului se admite a efectua doar în ziua examinării.

Determinarea activității f. VIII se efectuează prin metoda monostadială folosind setul de reagenți pentru determinarea activității factorului VIII de coagulare a sângelui în plasma sangvină. Se trasează două grafice: curba de calibrare a plasmei martor cu activitate cunoscută a f. VIII și curba crioprecipitatului investigat. În scop de trasare a acestor curbe din soluțiile inițiale de plasmă martor și crioprecipitat se prepară soluții diluate de 5, 10 și 50 ori cu activitate scăzută a f. VIII. Drept activitate de 100% a f. VIII se consideră activitatea plasmei martor, diluate de 5 ori. (ulterior se efectuează recalcularea în activitate reală a f. VIII în doza de crioprecipitat). În soluțiile preparate se determină PTTa și se trasează curba dependenței timpului de coagulare de activitatea f. VIII.

În scop de linealizare a curbelor se folosește hârtia cu scală logaritmică (este inclusă în set).

Pentru suplinirea factorilor de coagulare, concentrațiile cărora scad la diluarea crioprecipitatului și a plasmelor martor, în test-sistem se adaugă plasma bolnavilor cu hemofilie, în care practic lipsește (sub 2%) doar f. VIII, iar ceilalți factori sunt prezenți în concentrații normale.

Descrierea detaliată a metodei este dată mai jos.

Metoda se bazează pe principiile internaționale de standardizare a investigațiilor coagulologice, descrise anterior.

### Prepararea reagenților

Prepararea reagenților se efectuează la fel ca prepararea reagenților pentru determinarea activității f. VIII în plasma sangvină, descrisă anterior.

### Prepararea crioprecipitatului pentru analiză

Crioprecipitatul congelat este necesar a fi lichefiat, pentru aceasta punga cu crioprecipitat se introduce în baia marină la temperatura de +37°C. Peste 5-7 minute crioprecipitatul trebuie să se topească complet și să se transforme într-o soluție transparentă de culoare gălbuie. Pentru efectuarea examinării este nevoie de 0,5 ml de crioprecipitat.

### Trasarea curbei de calibrare

Pentru trasarea curbei de calibrare diluați de 5, 10 și 50 ori plasma martor cu valoare cunoscută a activității f. VIII cu soluție tampon imidazolic. Modalitatea de diluție este indicată în tabelul (21):

În toate soluțiile diluate de plasmă martor determinați PTTa, folosind următoarea metodă:

1. Încălziți soluția de clorură de calciu la temperatura de + 37°C (5 min).
2. Introduceți în 3 eprubete:
  - câte 0,1 ml plasmă martor, diluată de 5, 10, sau de 50 ori cu tampon imidazolic;
  - câte 0,1 ml plasmă din substrat;
  - câte 0,1 ml soluție de lucru de erlidă.

Particularitățile trasării curbei de calibrare a plasmelor martor

Tabelul 21

Numărul eprubetelor	1	2	3
Diluția	de 5 ori	de 10 ori	de 50 ori
Activitatea f. VIII în % (axa X)	100	50	10
Activitatea f. VIII în UI/ml (axa X)	1,0	0,5	0,1
Tampon, ml	0,8	0,5	0,9

Plasmă martor, ml	0,2	-	-
Amestecați și transferați în altă eprubetă. ml	0,1    0,4	↑	0,2 ↑

4. Amestecați conținutul eprubetelor prin rotire și încălziți timp de 5 min la temperatura de +37°C.

5. Introduceți în aceleași eprubete câte 0,1 ml de soluție încălzită (+37°C) de clorură de calciu, amestecați prin rotire și determinați timpul de coagulare în fiecare din soluția diluată a plasmei de cercetat din momentul adăugării soluției de clorură de calciu.

Depuneți pe hârtia semilogaritmică (intră în componența setului):

- pe axa lineară verticală a ordonatelor (Y) - durata PTTa pentru fiecare soluție diluată de plasmă martor, în secunde;
- pe axa logaritmică orizontală a absciselor (X) - activitatea f. VIII. în %, corespunzătoare diluției soluției respective de plasmă martor (vedeți tabelul 21).

La unirea punctelor depuse se formează o linie dreaptă a curbei de calibrare, conform căreia se determină activitatea crioprecipitatului în % sau în UI/ml.

### Trasarea curbei crioprecipitatului

Concentrația crioprecipitatului diferitor producători variază într-un diapazon relativ mare, aproximativ de la 200 până la 600% (de la 2 UI/ml până la 6 UI/ml). Considerând faptul, că metoda de apreciere a activității f. VIII în crioprecipitat se bazează pe corespunderea activității soluțiilor diluate de plasmă martor și crioprecipitatului, o importanță mare se acordă diluției premergătoare a crioprecipitatului, care urmează a fi selectată în mod experimental. Pentru aceasta crioprecipitatul se diluează în prealabil de 10 și 20 ori. După aceasta fiecare din soluțiile obținute urmează a fi diluată încă de 3 ori: de 5, 10 și 50 ori (la fel ca și plasma martor), considerând a doua diluție de 5 ori drept 100% de activitate a f. VIII. Pentru ilustrare pe desenul 4 este reprezentată schema diluției crioprecipitatului.

Fiecare producător trebuie să selecteze de sinestătător în mod experimental, care este diluția premergătoare a crioprecipitatului, ce urmează a fi acceptată: de 10 sau de 20 ori.

Drept criteriu de corectitudine a diluării premergătoare a crioprecipitatului servește timpul de coagulare în testul timpului de tromboplastină parțială activată (PTTa), care la diluția crioprecipitatului de 5, 10 și 50 ori trebuie să fie mai îndelungat decât timpul de coagulare al plasmei martor. În acest caz curba crioprecipitatului trebuie să fie dispusă anterior de curba de calibrare a plasmei martor.

În tabelul 2 sunt prezentate particularitățile de diluare a crioprecipitatului și sunt dați coeficienții de recalculare (cu bold) pentru calculul activității reale, de până la diluare, a crioprecipitatului.

### Particularitățile de diluare a crioprecipitatului

Numărul eprubetelor	0	1	2	3
Diluția	Premergătoare (10, 20)	de 5 ori	de 10 ori	de 50 ori
Activitatea f. VIII în % (axa X)		100	50	10
Activitatea f. VIII în UI/ml (axa X)		1,0	0,5	0,1
Coeficientul de recalculare pentru determinarea activității inițiale a crioprecipitatului (1, 2, 3)	10 (0,1+0,9) 20 (0,1+1,9)	10 20	20 40	100 200
Tampon, ml	-	0,8	0,4	0,8
Amestecați fără a forma spumă crioprecipitatul în prealabil diluat și transferați în altă eprubetă. ml	0,2	0,4	0,2	

### Modul de lucru

În toate soluțiile diluate de crioprecipitat determinați PTTa, folosind următoarea metodă:

- Încălziți soluția de clorură de calciu la temperatura de +37°C timp de 10 min;
- Introduceți în 3 eprubete:
  - câte 0,1 ml soluții din eprubetele 1- 3 cu crioprecipitat;
  - 0,1 ml plasmă din substrat;
  - 0,1 ml soluție de lucru de erolidă.
- Amestecați conținutul eprubetelor prin rotire, porniți cronometrul și încălziți eprubetă timp de 5 min la temperatura de +37°C.
- Exact la a 300-ea secundă de la începutul încălzirii introduceți în aceeași eprubetă 0,1 ml soluție de clorură de calciu încălzită (+37°C), amestecați prin rotire și cronmetrați timpul de coagulare din momentul adăugării soluției de clorură de calciu în fiecare din cele 3 eprubete.
- Pe aceeași hârtie semilogaritmă, cu curba de calibrare, depuneți:
  - pe axa lineară verticală a ordonatelor (Y) - valoarea PTTa pentru fiecare soluție diluată de crioprecipitat în secunde;
  - pe axa logaritmică orizontală a absciselor (X) - activitatea f. VIII, corespunzătoare diluției soluției respective (vedeți tabelul 22).
- Convingeți-vă de faptul, că cele două curbe sunt paralele. În lipsa paralelismului (fapt care indică variabilitatea componentei crioprecipitatului de la donori diferiți și metodele diferite de recoltare) activitatea f. VIII urmează a fi determinată pentru toate cele trei puncte, considerând media aritmetică a valorilor drept valoare reală a activității.
- În cazul paralelismului celor două curbe determinați activitatea f. VIII în crioprecipitatul diluat după un singur punct, trasând din punctul, corespunzător celei de-a doua diluții a crioprecipitatului de 5 ori (sau din oricare alt punct), o linie dreaptă, paralelă cu axa X, până la intersecția ei cu curba de calibrare. Din punctul de intersecție coborâți în jos o perpendiculară până la intersecția ei cu axa X, pe care sunt depuse valorile activității f. VIII, și astfel determinați activitatea crioprecipitatului diluat.
- Efectuați recalcularea datelor în valorile reale ale activității f. VIII în crioprecipitat conform

următoarei formule (1):

$$A_K = \frac{A_p \times K_p \times A_{ATT}100}{A_{ATT}100}$$

unde:

$A_K$  – valoarea reală căutată a activității f. VIII în crioprecipitat în % sau în UI/ml;

$A_p$  – valoarea activității f. VIII în soluțiile de crioprecipitat din eprubetele 1-3, obținută folosind curba de calibrare, în % sau în UI/ml;

$K_p$  – coeficientul de diluare a crioprecipitatului în eprubeta corespunzătoare (se obține conform formulei (2):

$$K = \frac{\text{diluția premergătoare} \times \text{diluția în eprubeta 1, 2 sau 3}}{\text{diluția în eprubeta 1}}$$

$A_{ATT}$  – activitatea cunoscută a f. VIII în plasma martor, în % sau în UI/ml.

9. Calculați activitatea f. VIII în întreaga doză a crioprecipitatului conform formulei (3):

$$A_{\text{CRIO ÎN DOZĂ}} = A_{\text{CRIO}} \times V_{\text{DOZĂ}}$$

unde:

$A_{\text{CRIO ÎN DOZĂ}}$  - activitatea f. VIII în întreaga doză a crioprecipitatului, UI;

$A_{\text{CRIO}}$  - activitatea f. VIII în crioprecipitatul inițial în UI/ml;

$V_{\text{DOZĂ}}$  – volumul dozei crioprecipitatului, ml.

### Caracteristicile analitice

Activitatea f. VIII în plasma normală - 90- 100 % sau 0 9-1,0 UI/ml.

Coeficientul de variabilitate a rezultatelor la determinarea activității f. VIII în crioprecipitat nu este mai mare de 10%.

Variația admisibilă a rezultatelor determinate ale activității f. VIII în crioprecipitat la utilizarea diferitor seturi din aceeași serie nu este mai mare de 10%. Linearitatea valorilor determinate ale activității f. VIII în crioprecipitat este de la 5 până la 100%.

Sensibilitatea determinată a metodei - 2,0 %.

### Condițiile de păstrare și de utilizare

Setul se va păstra la temperatura de + 2-8°C pe durata întregii perioade de valabilitate a setului (1 an). Se admite păstrarea la temperatura de până la + 25°C timp de 10 zile. Congelarea nu se admite.

Soluția de erolidă în caolină poate fi folosită pentru investigații timp de 2 săptămâni cu condiția de păstrare la temperatura de + 2 - 8°C.



După deschiderea flacoanelor cu soluție de clorură de calciu aceasta poate fi folosită repetat cu condiția ermetizării suficiente a flacoanelor. Soluția de clorură de calciu care a fost încălzită la efectuarea testelor, nu se va utiliza repetat.

Plasma martor și plasma din substrat se admite a fi folosite pentru analize doar timp de 2 ore după preparare. Soluția de tampon imidazolic poate fi păstrată la temperatura de + 2-8°C nu mai mult de 20 zile.

Un set este destinat pentru efectuarea a 45 determinări la consumul fiecărui reagent de 0,1 ml pentru o analiză.

### **Cel mai frecvent întâlnite erori tehnice**

Cele mai răspândite erori tehnice, comise în timpul examinării hemostazei, sunt asociate următoarelor situații:

- recoltarea incorectă a probelor de sânge, în timpul căreia are loc activarea procesului de coagulare;
- raportul incorect a volumelor de sânge și anticoagulant;
- pătrunderea heparinei în probă (prelungirea pronunțată a PTTa);
- temperatura neadecvată din termostat în timpul efectuării testelor;
- utilizarea sticlăriei nesiliconate (activarea coagulării);
- utilizarea în repetate rânduri a recipientelor getabile din plastic (activarea coagulării);
- utilizarea pentru spălarea recipientelor a detergenților, care influențează coagularea.

### **Obținerea plasmelor pentru analize**

În timpul pregătirii pentru investigarea sistemului de hemostază este necesar a ține cont de faptul, că procesele de coagulare a sângelui decurg cu implicarea unor sisteme enzimatice foarte sensibile, fiecare component al cărora este ușor supus activării sau inhibării. Fiecare manipulare, începând cu procedura de recoltare a sângelui și pregătirea sticlăriei de laborator, trebuie să fie strict coordonată.

Sângele se recoltează dimineața pe nemâncate, din vena cubitală, cu ajutorul unui ac siliconat cu diametru mare, fără seringă și fără a aplica garoul. Primele picături de sânge se îndepărtează, deoarece ele conțin tromboplastină. Sângele se amestecă imediat (într-o eprubetă siliconată de sticlă sau din plastic) cu soluție de citrat de sodiu în proporție de 9:1.

De menționat, că citratul de sodiu poate fi în 2 forme: trisodic ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times 5,5 \text{ H}_2\text{O}$ ) și bisodic ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ). În primul caz pentru prepararea soluției este necesar a dizolva în 1,0 l de apă distilată 38,0 g de sare, în al doilea caz – 31,3 g. Pentru comoditatea utilizatorilor FȘP "PEHAM" produce soluție de citrat de sodiu (trisodic, de 38%) de 10 ori mai concentrată. Pentru a obține soluția necesară pentru lucru concentratul se va dilua de 10 ori (1:9) cu apă distilată.

Pentru studierea hemostazei se folosesc 2 tipuri de plasmă sangvină: *plasma săracă în trombocite*, și *plasma bogată în trombocite*.

**Plasma, bogată în trombocite**, se obține prin centrifugarea sângelui citrat timp de 5-10 min la o turație de 1000-1500 turații/min (450- 500 g).

**Plasma, săracă în trombocite**, se obține prin centrifugare dublă: întâi se obține plasma bogată în trombocite, apoi plasma bogată în trombocite se transferă într-o eprubetă curată din plastic și se

centrifugează încă o dată timp de 15-20 min la temperatura de 4°C la o turație de 3000-4500 turații/min (1200-2000 g).

Dacă se intenționează a folosi plasma pentru determinarea timpului de protrombină, examinarea activității factorului VII sau pentru studierea funcțiilor trombocitelor, se recomandă a păstra plasma la temperatura camerei (+18-25°C), deoarece la +2-8°C are loc activarea factorului VII. Pentru efectuarea tuturor celorlalte teste plasma se păstrează la temperatura de +2-8°C.

O condiție obligatorie este efectuarea tuturor analizelor nu mai târziu de timp de 2 ore după recoltarea sângelui. Se admite congelarea singulară a probelor de plasmă săracă în trombocite la temperatura de - 20 - 40°C pentru un termen de câteva săptămâni fără pierderea importantă a activității factorilor de coagulare a sângelui.

### **Prelucrarea recipientelor de laborator**

Pentru asigurarea exactității și reproductibilității rezultatelor examinării sistemului de hemostază este necesar a acorda o atenție deosebită pregătirii recipientelor de laborator: eprubetelor, cuvelor, pipetelor. Cel mai indicat este a folosi în aceste scopuri recipiente getabile din plastic, ceea ce se și practică peste hotare. În caz că există necesitatea utilizării repetate a recipientelor de laborator, inclusiv a celor de sticlă, acestea trebuie curățate corespunzător. Nu se admite utilizarea amestecurilor cu crom, a diferitor prafuri de spălat, deoarece amestecurile cu crom, fie și în cantități minime, inhibă factorii de coagulare a sângelui, iar detergenții scad reproductibilitatea rezultatelor.

Noi recomandăm ca recipientele din plastic și din sticlă (cuvele, eprubetele, canulele pipetelor) să se prelucreze după utilizare timp de 2-3 ore în soluție de peroxid de hidrogen 6% în spălătorul cu ultrasunet. După aceasta este necesar a spăla minuțios recipientele în apă curgătoare, a le clăti cu apă distilată și a le usca. Recipientele din plastic se usucă în aer liber, iar cele din sticlă - în dulapul pentru uscare la temperatura de 180 - 200°C timp de 1-2 ore.

După clătire și uscare este necesar a silicona recipientele din sticlă.

### **Siliconarea recipientelor de sticlă**

Recipientele de laborator din sticlă nu pot fi folosite pentru studierea sistemului de hemostază, deoarece suprafața sticlei este încărcată negativ și activează procesele de coagulare a sângelui. Considerând acest lucru, înainte de a utiliza recipiente din sticlă, ele trebuie siliconate, adică acoperite cu un strat subțire de silan. Întreaga procedură de siliconare se efectuează doar în nișă.

Cel mai frecvent se întrebuițează dimetildiclorosilanul. Se umplu patru eprubete curate și uscate cu soluție 5% de acest silan în toluol, după care soluția se îndepărtează pentru utilizări repetate. Pipetele din sticlă se umplu din baloane de cauciuc. După aceasta recipientele se usucă în aer liber în nișă timp de 10-12 ore și ulterior în dulapul de uscare la temperatura de 100-150°C. După 4-5 utilizări procedura de siliconare se repetă.

### **Cerințele față de dispozitive**

Aprecierea rezultatelor testării se efectuează atât manual, cu utilizarea băilor de apă termostatabile, și cronometrelor, cât și cu utilizarea coagulometrelor complet automatizate sau semiautomate. Temperatura băilor de apă nu trebuie să varieze în limite, ce depășesc  $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ .

În funcție de principiul de funcționare coagulometrele se împart în 3 tipuri: mecanice, optico-mecanice și optice. În funcție de gradul de automatizare coagulometrele se împart în complet automatizate și semiautomate.

Drept exemplu de **coagulometre mecanice** pot servi coagulometrele semiautomate KC-1A, KC-4A, KC-10A (adică, cu unul, patru și zece canale respectiv) ale firmei Amelun, Germania; AO MEJIT, Rusia. Principiul de funcționare a coagulometrelor mecanice: într-o cuvă, care se rotește în jurul axei longitudinale se introduce o bilă de oțel, rotirea căreia se încetinește la formarea de fibrină; impulsurile transductorului magnetic sunt transmise unui dispozitiv de înregistrare. Coagulometrele de acest tip dispun de un termostat și un bloc de înregistrare.

Drept exemplu de **coagulometre optice** pot servi dispozitivele din seria C ale firmei Behnk Elektronik, Germania; ale firmei Organon, Olanda; Bio-Merix, Franța. Principiul de funcționare: modificarea permeabilității mediului pentru razele de lumină în procesul micșorării transparenței lui ca rezultat al formării filamentelor de fibrină. Pentru a respecta durata egală a timpului de incubare a câtorva probe, aparatul dispune de un mecanism de rotire a cuvelor cu probe, iar timer-ul incorporat începe numărătoarea inversă doar în momentul atingerii de către toate probele a aceleiași temperaturi.

**Coagulometrele optico-mecanice** permit a lucra cu mediile netransparente. Drept exemplu de asemenea dispozitive pot servi coagulometrele din seria CE și Trombostat ale firmei Behnk Elektronik, Germania. Principiul de funcționare: modificarea densității optice și viscozității mediului. Filamentele formate de fibrină împiedică transmiterea impulsului electric, moment care se va nota cu ajutorul timer-ului. Dispozitivele de acest tip sunt inutilizabile doar la investigarea plasmelor cu conținut sporit de fibrinogen (1000 mg/dl), deoarece se poate crea o situație, când cheagul încă nu este format pe deplin, iar dispozitivul arată deja timpul de coagulare.

Înainte de utilizare toate coagulometrele trebuiesc verificate, iar datele examinărilor trebuiesc confruntate cu datele, obținute prin metoda manuală. Este, de asemenea, necesar a vă convinge de corectitudinea indicilor de temperatură și de corectitudinea înregistrării punctului final al reacției. Se impune verificarea permanentă a funcționării tuturor coagulometrelor. La compararea rezultatelor testării, obținute cu ajutorul diferitor coagulometre, se va ține cont de faptul, că dispozitivele înregistrează în mod diferit punctul final al reacției, ceea ce influențează datele obținut.

## **4.METODILE BIOLOGICE**

### **4.1. METODICA DETERMINĂRII PIROGENITĂȚII**

Experimentul se efectuează pe iepuri sănătoși de ambele sexe cu greutatea de 1,5 - 3,5 kg și regim obișnuit de alimentare. Iepurii se selectează cu 5 zile înainte de experiment, se plasează în cuști separate, aflate într-o încăpere cu temperatură constantă (devierile admisibile de temperatură sunt de  $\pm 3^{\circ}\text{C}$ ). În timpul curățirii cuștilor și cântăririi animalelor se evită excitarea acestora (se evită zgomotul, ciocănirea, mișcările bruște). Cântărirea animalelor se efectuează peste o zi, înainte de hrănire, în sumă nu mai puțin de 3 ori. Pe parcursul perioadei precedente experimentului iepurii nu trebuie să scadă ponderal. A

Animalele cu scăderi ponderale nu se vor încadra în experiment. Cu 3 zile înainte de experiment zilnic, înainte de hrănire, se măsoară temperatura matinală, folosind un termometru electric, exactitatea căruia este comparabilă cu exactitatea termometrului medical. Elementul sensibil al termometrului electric sau termometrul cu mercur se introduce în rectul animalului astfel, încât să treacă de sfincterul intern, la o adâncime de aproximativ 5 cm și se lasă pentru perioada de timp necesară pentru atingerea temperaturii maxime, dar nu mai puțin de 5 minute. Măsurarea temperaturii se va efectua nu mai degrabă decât la o

oră după fixarea iepurelui. Temperatura inițială a iepurilor supuși experimentului trebuie să fie în limitele 38,5 – 39,5°C. Animalele cu temperatură mai mare sau mai mică nu se vor încadra în experiment.

Cu 24 ore înainte de experiment iepurii se transferă în încăperea, în care se va efectua determinarea apirogenității. Aceasta trebuie să fie o încăpere separată cu temperatură constantă de 18- 22°C, izolată acustic și cu o atmosferă liniștită. În seara precedentă experimentului din cuștile iepurilor se vor scoate resturile de hrană; până la experiment și pe parcursul experimentului animalele nu se hrănesc (cantitatea de apă până la experiment nu se limitează). Preparatul de analizat se testează pe 3 iepuri. Înainte de injectarea preparatului de analizat temperatura iepurilor se măsoară de cel puțin 2 ori la un interval de 30 minute. Diferența dintre valorile celor două măsurări nu trebuie să depășească 0,2°C. Valoarea medie a celor două măsurări se consideră temperatură normală și servește drept punct de referință pentru determinarea creșterii de temperatură.

Cu ajutorul unei seringi sterile preparatul de analizat steril se injectează lent în vena marginală a urechii. Pentru fiecare iepure următor se ia un ac nou. Preparatul de analizat se încălzește în prealabil până la temperatura de 37°C și se injectează nu mai târziu de 30 minute după măsurarea temperaturii inițiale. După injectarea preparatului temperatura se măsoară de 3 ori la intervale de o oră.

Volumul injectat de preparat de analizat și criteriile de interpretare a rezultatelor trebuie să fie indicate în farmacopee pentru fiecare preparat în parte.

Iepurii, care au fost încardați în experiment, pot fi utilizați repetat pentru determinarea pirogenității (dar nu mai mult decât de 3 ori) la intervale de 2-3 zile cu condiția, că preparatul introdus anterior, s-a dovedit a fi apirogen. În caz că preparatul introdus anterior a fost pirogen, animalele nu mai pot fi încadrate în experiment.

### Bibliografie selectivă:

1. Farmacopeia de Stat URSS. X, Moscova 1990;
2. Articolul farmaceutic „Metodele de control fizico-chimice, imunochimice și fizice preparatelor imunobiologice”;
3. Ordinul URSS nr.31 din 13.01.1983 „Despre unificarea metodelor de control a preparatelor biomedicale” Moscova, 1983;
4. Directiva 2003/94/CE a Comisiei din 08.10.2003 despre stabilirea principiilor și orientărilor privind buna practică de fabricație cu privire la produsele medicamentoase de uz uman și medicamentele experimentale de uz uman.