

EL TEXTO EN COLOR ROJO HA SIDO MODIFICADO

Con fundamento en el numeral 4.11.1 de la Norma Oficial Mexicana NOM-001-SSA1-2010, se publica el presente proyecto a efecto que los interesados, a partir del 1° de agosto y hasta el 30 de septiembre de 2015, lo analicen, evalúen y envíen sus observaciones o comentarios en idioma español y con el sustento técnico suficiente ante la CPFEUM, sito en Río Rhin número 57, colonia Cuauhtémoc, código postal 06500, México, DF Fax: 5207 6890
Correo electrónico: consultas@farmacopea.org.mx.

MPB 0580. DETERMINACIÓN DE HEPARINA EN LOS FACTORES DE LA COAGULACIÓN

Método A

Ensayo cromogénico en el cual se estima la actividad de heparina como complejo antitrombina III por el efecto inhibitorio sobre el factor Xa (actividad anti-Xa). Un exceso de antitrombina III es mantenido en la durante la reacción para asegurar una concentración constante del complejo Heparina-Antitrombina III. El factor Xa es neutralizado por el complejo Heparina-Antitrombina III y el factor Xa residual hidroliza un sustrato cromogénico peptídico específico para liberar un cromóforo que puede ser cuantificado espectrofotométricamente. La cantidad de cromóforo es inversamente proporcional a la actividad de heparina.

Sustrato cromogénico de factor Xa. Emplear un sustrato cromogénico específico para factor Xa como el cloruro de N-benzoil-L-isoleucil-L-glutamil-glicil-L-arginina-4-nitroanilida. Reconstituir según instrucciones del fabricante.

Solución reguladora. Solución de 6.05 g por litro de Tris(hidroximetil) aminometano, de ser necesario, ajustar pH a 8.4 con ácido clorhídrico.

Solución de prueba. Diluir la preparación en ensayo con Solución reguladora y obtener una solución de aproximadamente 0.1 UI de heparina por ml.

Solución de referencia. Diluir con Solución reguladora y obtener una solución de 0.1 UI por ml de heparina.

Procedimiento. Las siguientes condiciones de trabajo aplican a microplacas de 96 pozos. Si el ensayo es llevado a cabo en tubos, los volúmenes deben ser ajustados manteniendo la proporción en la mezcla. Antes de iniciar el ensayo, mantener todas las soluciones en un baño de agua a 37 °C. Distribuir en una serie pocillos de la placa, preferentemente por duplicado, 20 µl de Plasma humano normal y 20µl de Solución de antitrombina III. Agregar a los pocillos volúmenes crecientes en progresión aritmética (por ejemplo 20µl, 60 µl, 100 µl y 140 µl) de la Preparación muestra o la Preparación estándar y

completar a un volumen final de 200µl empleando Solución reguladora (0.02 a 0.08 UI por ml de heparina en la mezcla final de reacción). Las concentraciones se pueden modificar si con ellas se obtienen una mejor linealidad en la relación dosis-respuesta. Transferir 40µl de cada tubo o pocillo a una segunda serie de los pocillos, agregar 20µl de Solución de factor Xa bovino e incubar a 37 °C durante 30 s.

Método de punto final. Agregar 40 µl de una solución 1 mmol por litro de Sustrato cromogénico del factor Xa e incubar a 37 °C durante 3 min. Finalizar la reacción disminuyendo el pH agregado una solución al 20 % v/v de ácido acético glacial y medir la absorbancia a 405 nm. Los tiempos de reacción están comprendidos entre 3 y 15 min, pero se admiten variaciones si se obtiene una mejora en la linealidad de la relación dosis-respuesta.

Método cinético. Agregar 40 µl de una solución 2 mmol por litro de Sustrato cromogénico del factor Xa, incubar a 37 °C y cuantificar la velocidad de liberación del sustrato, que debe ser inversamente proporcional a la concentración de heparina, midiendo en un espectrofotómetro el cambio de absorbancia a una longitud de onda apropiada por monitoreo continuo de la absorbancia. Determinarla velocidad de cambio de absorbancia a 405 nm continuamente por un período de tiempo y obtenerla velocidad media del cambio de absorbancia ($\Delta A/\text{min}$).

Método B

La muestra es incubada con un exceso definido de trombina y un sustrato cromogénico específico para trombina. El aumento de la absorbancia (debida a la p-nitroanilina liberada) es cuantificado a 405 nm. El aumento es inversamente proporcional a la cantidad de heparina en la muestra.

Diluciones de la muestra. Reconstituir la muestra como lo indica la etiqueta y diluir con SA de cloruro de sodio al 0.7 % y citrato de sodio al 0.6 % a pH 7.3; para obtener aproximadamente 0.25 UI de heparina por mililitro. Preparar diluciones seriadas con la solución amortiguadora hasta 1:32. Dejar en reposo durante 30 min.

Diluciones de la referencia. Diluir la referencia de heparina con una SA de tris-hidroximetilaminometano al 0.6 %, ácido etilendinitrilotetra acético al 0.22 % y cloruro de sodio al 1.13 %, pH 8.4; para obtener 0.25 UI de heparina por mililitro. Preparar diluciones seriadas hasta 1:32.

Procedimiento. Depositar 200 µL de muestra, preparación de referencia y 200 µL de solución de antitrombina III que contenga 3 UI/mL en una serie de tubos de plástico. Mezclar, dejar en reposo durante 30 min y agregar a cada tubo 200 µL de una solución de trombina bovina que contenga 20 UI/mL, agitar con vortex e incubar a 37 °C durante 90 s.

Preparar una solución de sustrato cromogénico para trombina a una concentración de al menos el doble del valor de la K_m (constante de Michaelis-Menten).

Precalear la solución cromogénica a 37 °C y adicionar 200 µL a cada uno de los tubos de muestra y de referencia. Mezclar con vortex e incubar a 37 °C durante 90 s, detener la reacción agregando 200 µL de ácido acético al 50 % y medir la absorbancia a 405 nm.

Calcular el contenido de heparina en la muestra utilizando un método estadístico convencional.

CONSULTA