**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА**

**ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

**Испытание на гистамин ОФС
 Взамен ст. ГФ XII, ч.1, ОФС 42-0063-07**

Настоящая статья распространяется на определение содержания гистамина in vitro в лекарственных средствах для парентерального применения.

# Подготовка изолированного органа

В опыт берут морскую свинку-самца массой тела 200 − 350 г. За 24 ч до эксперимента животное лишают пищи, но оставляют воду. После эвтаназии у свинки вскрывают брюшную полость от лонного сочленения до грудины и находят слепую кишку. Место её перехода в ободочную кишку является ориентиром при поиске подвздошной кишки, которая отходит от слепой за 1 − 2 см до этого места.

Для того чтобы извлечь подвздошную кишку, тупым зажимом или пинцетом плотно захватывают её основание и отрезают ножницами. Отсечённый конец кишки слегка приподнимают, а затем без натяжения и, не перехватывая её, отсекают ткань брыжейки маленькими разрезами при помощи тупоконечных ножниц. Остатки брыжейки удалять не следует. Все манипуляции с подвздошной кишкой следует проводить осторожно, не растягивая её. Для эксперимента пригоден дистальный участок подвздошной кишки, исключая 10 − 15 см, ближайшие к слепой кишке.

Подвздошную кишку нарезают на равные части (около 6 см каждая) и помещают в чашку Петри с гипокальциевым раствором Тироде (примечание 1). Им осторожно промывают полученные отрезки с помощью шприца или резиновой груши с пастеровской пипеткой с затуплённым концом до полного удаления содержимого кишечника. Промытые отрезки подвздошной кишки помещают в чистый гипокальциевый раствор Тироде. Они могут быть использованы сразу или храниться в течение 24 ч при температуре от +2 до +4˚С (примечание 2).

Непосредственно перед экспериментом промытый отрезок кишки разрезают до длины, требуемой условиями эксперимента (10 мм при использовании электронного датчика или 20 мм при использовании механического рычага и кимографа).

**Приготовление разведений стандартного и испытуемого образца**

***1. Разведения стандартного образца (СО).***

В качестве СО используют гистамина дигидрохлорид в трёх разведениях: *разведение 1* (1,25 · 10–6 г/мл); *разведение 2* (2,50 · 10–6 г/мл) и *разведение 3* (5,00 · 10–6 г/мл), вызывающие 50%, 75% и 100% сокращение кишки соответственно. В качестве растворителя используют натрия хлорида 0,9% раствор.

***2. Разведение испытуемого образца (ИО).***

Испытанию подвергают неразведённый ИО, когда максимально допустимая нормативной документацией концентрация гистамина в неразведённом препарате находится в диапазоне от 1,25 · 10–6 г/мл до
2,50 · 10–6 г/мл. При необходимости ИО разводят натрия хлорида 0,9% раствором таким образом, чтобы предполагаемая концентрация гистамина дигидрохлорида в *разведении ИО* составляла 2,50 · 10–6 г/мл.

**Регистрирующая система**

Для регистрации сокращений изолированного отрезка подвздошной кишки морской свинки в изотонических условиях в ответ на введение СО и ИО используют регистрирующую систему, состоящую из термостатируемой ванночки с гипокальциевым раствором Тироде (35 ºС), а также электронного датчика с самописцем или механического рычага с кимографом. Ванночку аэрируют карбогеном (95% О2 и 5% СО2) или воздухом. Нагрузка обычно составляет 500 − 800 мг. В случае использования механического рычага, для её вычисления следует применять правило равновесия:

Сила · Плечо силы = Нагрузка · Плечо нагрузки.

**Проведение опыта**

Изолированный отрезок подвздошный кишки помещают в ванночку и прикрепляют к регистрирующей системе с помощью лигатуры по диагонали за противоположные концы: один − к крючку на дне ванночки, а другой − к датчику или рычагу. Прикладывают к отрезку нагрузку и оставляют его в покое на 30 мин. За это время необходимо не менее трёх раз сменить в ванночке раствор Тироде.

***1. Адаптация изолированного отрезка подвздошной кишки морской свинки к субмаксимальной дозе гистамина.***

В термостатируемую ванночку вводят СО в *разведении 3* в объёме, равном 1/100 от её ёмкости. Через 30 с. (время экспозиции) ванночку промывают тройным объёмом раствора Тироде. После первого отмывания проводят второе таким же объёмом раствора. Не менее чем через 4 мин. после первого введения снова повторяют цикл «введение–экспозиция–два отмывания». Эти циклы повторяют до тех пор, пока не получат не менее двух одинаковых пиков. Их высоту принимают за 100% (примечание 3). Интервалы между введениями испытуемого вещества и между двумя отмываниями должны быть постоянными.

***2. Испытание ИО на гистамин.***

Предварительное испытание.

После достижения постоянной величины ответа отрезка кишки на введение СО в *разведении 3*, проводят испытание ИО на гистамин. Для этого с интервалом не менее 4 мин. однократно в случайном порядке вводят СО в *разведении 1*, *разведении 3* и ИО. Циклы «введение–экпозиция–два отмывания» такие же, как и при проведении адаптации органа к субмаксимальной дозе.

В случае если пик, полученный в ответ на введение ИО, по высоте не меньше, чем пик СО в *разведении 1*, проводят количественное определение содержания гистамина в ИО (2.1). Если пик, полученный в ответ на введение ИО, меньше пика СО в *разведении 1* или вообще отсутствует, проводят контрольное испытание (2.2).

2.1. Количественное испытание ИО на гистамин.

В случайном порядке поочерёдно вводят СО в *разведении 1*, *разведении 3* и ИО до получения не менее чем четырёх пиков в ответ на введение каждого раствора. Находят среднее значение ответа отрезка кишки на каждый раствор. С помощью регрессионного анализа вычисляют параметры линейной зависимости среднего ответа кишки на СО от логарифма его концентрации. Затем, подставляя полученные значения этих параметров в уравнение регрессии, вычисляют, какой концентрации гистамина в *разведении* ИО соответствует средняя высота его пика и, исходя из этого, рассчитывают содержание гистамина в неразведённом ИО.

ИО считают прошедшим испытание, если найденное содержание гистамина не превышает максимально допустимое нормативной документацией (коэффициент пересчёта с гистамина дигидрохлорида на гистамин-основание равен 0,6038).

2.2. Контрольное испытание.

Схема его проведения такая же, как и при количественном определении содержания гистамина в ИО, за исключением того, что вместо ИО используют СО в *разведении 2*. Если средняя высота его пика соответствует вводимой концентрации гистамина дигидрохлорида в данном разведении
(2,50 · 10–6 г/мл), то результаты опыта следует признать достоверными.

Результаты опыта следует признать недостоверными в каждом из следующих случаев:

1. Средняя высота пика СО в *разведении 2* не соответствует вводимой концентрации гистамина дигидрохлорида в данном разведении
(2,50 · 10–6 г/мл).
2. При количественном определении содержания гистамина в ИО отсутствует воспроизводимость ответов отрезка кишки на введение ИО.
3. В процессе эксперимента наблюдается статистически значимое снижение высоты пиков в ответ на серию введений одного того же раствора (примечание 4).

В каждом из этих трёх случаев следует провести испытание ИО на вещества депрессорного действия (см.«Испытание на депрессорные вещества»).

***Примечания:***

1. *Состав и приготовление гипокальциевого раствора Тироде.*

Состав:

NaCl 80,00 г;

NaHCO3 10,00 г;

D-глюкоза 11,00 г;

KCl 2,00 г;

CaCl2∙2H2O 1,30 г;

MgCl2∙6H2O 2,10 г;

NaH2PO4∙H2O 0,58 г;

Воды дистиллированной до 10 л.

*Приготовление*:

В мерном цилиндре объёмом 1 л растворяют в дистиллированной воде навески NaCl, NaHCO3 и D-глюкозы в любом порядке. Доводят объём до метки и переливают содержимое цилиндра в 10-литровый стеклянный или полиэтиленовый сосуд с притёртой пробкой или завинчивающейся крышкой.

Таким же образом, но по отдельности, каждую из оставшихся навесок растворяют в 1 л воды дистиллированной и по очереди переносят в тот же 10-литровый сосуд, строго придерживаясь следующего порядка:

1) KCl

2) CaCl2

3) MgCl2

4) NaH2PO4

Затем доливают воду дистиллированную до отметки 10 л и вновь тщательно перемешивают.

Полученный раствор может храниться при температуре от +3 до +5 ºС не более 24 ч. Помутнение недопустимо.

Помутневший раствор следует вылить, тщательно промыть сосуд в проточной воде и прополоскать дистиллированной водой. Поверхностно активные моющие средства применять нельзя.

1. Сосуд, в котором находятся отрезки подвздошной кишки при хранении, плотно не закрывают, а затягивают двойным слоем марли, чтобы обеспечить доступ воздуха. Перед тем, как отрезки использовать в опыте их следует подготовить. Для этого сосуд в течение 10 мин. держат при комнатной температуре и в течение 20 мин. в термостате (35ºС). После нагревания из отрезка следует удалить слизь. Это достигается лёгкими поглаживающими движениями в продольном направлении.
2. Струя вводимого раствора должна быть направлена не прямо на изолированный отрезок кишки, а в сторону стенки ванночки, причём направление струи не должно меняться. Скорость введения должна быть максимально высокой и постоянной.

Регистрацию сокращений проводят непрерывно (скорость ленты 2 мм/мин.). В случае использования механического рычага и кимографа, писчик во время отмывания можно отводить и прекращать запись.

1. Каждую серию, состоящую не менее чем из четырёх пиков, полученных в результате введения одного и того же раствора, следует проверять с помощью теста Нойманна на дрейф:

|  |  |
| --- | --- |
|  | , где |

где: *x* − высота пика на введение одного и того же раствора;

*n* − число пиков, полученных в результате введения одного и того же раствора.

Значение *D* должно быть (*P* = 95%):

при *n* = 4—меньше 0,78;

при *n* = 5—меньше 0,82;

при *n* = 6—меньше 0,89.