**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

**Апротинин ФС**

**Апротинин**

**Aprotininum Взамен ВФС 42-2175-92**

*S*5,*S*55:*S*14,*S*38:*S*30,*S*51-Трицикло(L-аргинил-L-пролил-L-аспартил-L-фенилаланил-L-цистеинил-L-лейцил-L-глутамил-L-пролил-L-пролил-L-тирозил-L-треонилглицил-L-пролил-L-цистеинил-L-лизил-L-аланил-L-аргиил-L-изолейцил-L-изолейцил-L-аргинил-L-тирозил-L-фенилаланил-L-тирозил-L-аспарагинил-L-аланил-L-лизил-L-аланилглицил-L-лейцил-L-цистеинил-L-глутаминил-L-треонил-L-фенилаланил-L-валил-L-тирозилглицилглицил-L-цистеинил-L-аргинил-L-аланил-L-лизил-L-аргинил-L-аспарагинил-L-аспарагинил-L-фенилаланил-L-лизил-L-серил-L-аланил-L-глутамил-L-аспартил-L-цистеинил-L-метионил-L-аргинил-L-треонил-L-цистеинилглицилглицил-L-аланин)



|  |  |
| --- | --- |
| C284H432N84O79S7 | М.м. 6511,4 |

Содержит от 90,0 до 110,0 % от заявленного количества апротинина.

**Описание**. Белый или почти белый порошок. \*Гигроскопичен.

**Растворимость**. Легко растворим в воде и в 0,9 % растворе натрия хлорида, практически нерастворим в хлороформе.

**Подлинность.** Субстанция должна обладать ингибирующей активностью по отношению к трипсину (раздел "Количественное определение").

**Прозрачность раствора.** Раствор 0,25 г субстанции в 100 мл воды должен быть прозрачным**.**

**Цветность раствора.** Раствор, полученный в испытании «Прозрачность раствора», должен выдерживать сравнение с эталоном Y7 (ОФС «Степень окраски жидкостей», метод 2).

**рН.** От 6,0 до 8,0 (0,25 % раствор, ОФС «Ионометрия», метод 3).

**Специфические примеси**. 12,5 мг субстанции растворяют в 10 мл воды и прибавляют 2 мл 20 % раствора сульфосалициловой кислоты; внешний вид раствора при 20-25 °С не должен изменяться в течение 5 мин.

**Олигомеры апротинина.** Определение проводят методом эксклюзионной хроматографии.

*Подвижная фаза (ПФ).* Ацетонитрил – уксусная кислота – вода 2:2:6.

*Испытуемый раствор.* Около 18 мг (точная навеска) субстанции помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, растворяют в воде и доводят объём раствора водой до метки.

*Раствор сравнения А*. Около 30 мг субстанции помещают в стеклянный флакон с завинчивающейся крышкой и выдерживают в сушильном шкафу при 110±5 °С в течение 4 ч.После охлаждения около 18 мг (точная навеска) субстанции помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, растворяют в воде и доводят объём раствора водой до метки.

*Раствор сравнения Б.* 1,0 мл испытуемого раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят объём водой до метки.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | Три последовательно соединённые колонки 30 × 0,78 см, силикагель гидрофильный для хроматографии, подходящий для разделения глобулярных белков с относительной молекулярной массой от 20 000 до 10 000 000, 8 мкм; |
| Температура колонки | 25 °С; |
| Скорость потока | 1,0 мл/мин; |
| Детектор | спектрофотометрический, 277 нм; |
| Объём пробы | 100 мкл |
| Время хроматографирования | 40 мин. |

Хроматографируют испытуемый раствор и растворы сравнения.

*Идентификация примесей.* Хроматограмма раствора сравнения А используется для идентификации пика димера апротинина.

*Относительные времена удерживания соединений.* Мономер апротинина – 1 (около 25 мин); димер апротинина – около 0,9.

*Пригодность хроматографической системы.* На хроматограмме раствора сравнения А:

- *разрешение (R)* между пиками мономера и димера апротинина должно быть не менее 1,3;

- *фактор асимметрии* пика (*AS*) мономера апротинина должен быть не более 2,5.

*Допустимое содержание примесей.* На хроматограмме испытуемого раствора:

- площадь пика любой примеси должна быть не более площади пика основного пика на хроматограмме раствора сравнения Б (не более 1,0 %);

- суммарная площадь пиков всех примесей должна быть не более площади основного пика на хроматограмме раствора сравнения Б (не более 1,0 %).

Не учитывают пики, площадь которых менее 0,05 площади основного пика на хроматограмме растворасравнения Б (менее 0,05 %).

**Потеря в массе при высушивании.** Не более 10,0 % (ОФС "Потеря в массе при высушивании", способ 2). Для определения около 0,1 г (точная навеска) субстанции сушат до постоянной массы, не менее 24 ч, при атмосферном давлении и комнатной температуре.

**Сульфатная зола.** Не более 3,0 % (ОФС «Сульфатная зола»). Для определения используют около 0,2 г (точная навеска) субстанции.

**Пирогенность.** Субстанция должна быть апирогенной (ОФС «Пирогенность»). Тест-доза: 10 000 КИЕ субстанции в 1 мл 0,9 % раствора натрия хлорида на 1 кг массы кролика.

**Гистамин.** Не более 0,2 мкг гистамина на 1 мг субстанции (ОФС «Испытание на гистамин»). Тест-доза: 2 000 КИЕ субстанции в 1 мл 0,9 % раствора натрия хлорида на 1 кг массы кролика.

**Микробиологическая чистота**. В соответствии сОФС «Микробиологическая чистота».

**Количественное определение.** Определение проводят методом спектрофотометрии.

Метод основан на определении изменения количества *п*-нитроанилина, освобождаемого трипсином из синтетического субстрата – гидрохлорида *N*α-бензоил-DL-аргинин-*п*-нитроанилида (БАПНА, CAS 911-77-3) в присутствии апротинина. Все растворы используют свежеприготовленными.

*Испытуемый раствор.* Около 4,0 мг (точная навеска) субстанции помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, растворяют в 0,1 М трис – гидрохлорид буферном растворе pH 7,8 и доводят объём раствора тем же растворителем до метки. 1,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

*Раствор стандартного образца апротинина.* Точную навеску стандартного образца апротинина, соответствующую около 20 000 КИЕ, растворяют в 2 мл 0,9 % раствора натрия хлорида. 1,0 мл полученного раствора апротинина помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл и доводят объём раствора 0,1 М трис – гидрохлорид буферным раствором pH 7,8 до метки. 1,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

*Раствор трипсина.* Около 4,5 мг (точная навеска) трипсина помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 0,1 М трис – гидрохлорид буферном растворе pH 7,8 и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

*Раствор субстрата.* 0,1 г (точная навеска) БАПНА растворяют при 35 ± 2 °С в 10 мл диметилсульфоксида.

*Построение калибровочного графика*

В 5 пронумерованных пробирок помещают 0; 0,1; 0,2; 0,3 и 0,4 мл раствора стандартного образца апротинина. В пробирки прибавляют соответственно 4,6; 4,5; 4,4; 4,3 и 4,2 мл 0,1 М трис – гидрохлорид буферного раствора pH 7,8.

Во все пробирки прибавляют по 0,2 мл раствора трипсина и термостатируют в течение 5 мин при 25,0 ± 0,5 °С.

Во все пробирки в определённом порядке с интервалом 30 с прибавляют по 0,2 мл раствора субстрата и продолжают термостатирование при 25,0±0,5 °С в течение 900 с.

Для остановки реакции, во все пробирки в том же порядке с интервалом в 30 с прибавляют по 1,0 мл 5 М раствора уксусной кислоты и перемешивают.

Измеряют оптическую плотность растворов в опытных пробирках на спектрофотометре при длине волны 405 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм по сравнению с раствором, содержащим 5,0 мл 0,1 М трис – гидрохлорид буферного раствора pH 7,8, 0,2 мл раствора субстрата и 1,0 мл 5 М раствора уксусной кислоты.

Калибровочный график строят, откладывая по оси ординат оптическую плотность, а по оси абсцисс – количество стандартного образца апротинина в КИЕ.

*Проведение анализа*

Определение ингибирующей активности препарата проводят в пробирках вместимостью 20 мл по следующей схеме:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | Испытуемая проба | Трипсиновая проба | Контрольная проба |
| Испытуемый раствор | 0,2 мл | - | - |
| Раствор трипсина | 0,2 мл | 0,2 мл |  |
| 0,1 М трис – гидрохлорид буферный раствор pH 7,8 | 4,4 мл | 4,6 мл | 4,8 мл |
| Содержимое пробирок быстро перемешивают и выдерживают 5 мин в водяной бане при 25±0,5 °С. | | | |
| Раствор субстрата, нагретый до 25 °С | 0,2 мл | 0,2 мл | 0,2 мл |
| Содержимое пробирок быстро перемешивают и выдерживают 900 с при 25±0,5 °С. | | | |
| 5 М раствор уксусной кислоты | 1,0 мл | 1,0 мл | 1,0 мл |
| Содержимое пробирок быстро перемешивают. | | | |

Измеряют оптическую плотность испытуемой и трипсиновой проб на спектрофотометре при длине волны 405 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм по сравнению с контрольной пробой.

Оптическая плотность трипсиновой пробы должна быть в пределах от 0,35 до 0,5. В ином случае навеску трипсина соответственно изменяют. Оптическая плотность испытуемой пробы должна составлять 30-70 % от оптической плотности трипсиновой пробы, в противном случае необходимо изменить количество испытуемого раствора, скорректировав одновременно объём 0,1 М трис – гидрохлорид буферного раствора pH 7,8 так, чтобы общий объём равнялся 5,0 мл.

Активность субстанции (*Х*) в калликреиновых единицах на миллиграмм вычисляют по формуле:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где |  | − | количество испытуемого раствора, найденное по калибровочному графику, калликреиновые единицы (КИЕ); |
|  |  | − | навеска субстанции, мг; |
|  |  | − | разведение, мл; |
|  | 0,2 | − | объём испытуемого раствора, взятого для анализа, мл. |

**Хранение**. В защищённом от света месте.

\*Приводится для информации.