**Апротинин, ФС**

**лиофилизат для приготовления**

**раствора для внутривенного**

**введения**

**Апротинин,**

**лиофилизат для приготовления**

**раствора для внутривенного**

**введения**

 **Вводится впервые**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на лекарственный препарат апротинин, лиофилизат для приготовления раствора для внутривенного введения. Препарат должен соответствовать требованиям ОФС «Лиофилизаты», ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения» и ниже приведенным требованиям.

Содержит не менее 90,0 % и не более 110,0 % от заявленного количества калликреиновых единиц (КИЕ).

1 калликреиновая единица соответствует 0,75 антитрипсиновых единиц. 1000 калликреиновых единиц соответствуют 0,56 апротининовых единиц Европейской фармакопеи.

**Описание**. Содержание раздела приводится в соответствии с требованиями ОФС «Лиофилизаты».

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

**Время растворения**. Не более 3 мин (ОФС «Время растворения»).

К содержимому флакона прибавляют при комнатной температуре 2 мл натрия хлорида раствора 0,9 % и непрерывно встряхивают до полного растворения. Визуально определяют время, за которое произошло полное растворение содержимого флакона.

**Прозрачность раствора**. 0,2 % раствор препарата должен быть прозрачным (ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей»).

**Цветность раствора**. 0,2 % раствор препарата должен выдерживать сравнение с эталоном Y6 (ОФС «Степень окраски жидкостей», метод 2).

**рН**. От 4,5 до 7,5 (0,2 % раствор препарата, ОФС «Ионометрия», метод 3).

**Олигомеры апротинина.** Не более 1,5 %.Определение проводят методом эксклюзионной хроматографии (ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография»).

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

*Испытуемый раствор.* Навеску препарата, соответствующую 90000 КИЕ помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, растворяют в воде и доводят объём раствора водой до метки.

*Раствор для проверки пригодности хроматографической системы.* 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 18 мг субстанции помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, растворяют в воде и доводят объём раствора 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 раствор для проверки пригодности хроматографической системы.

*Идентификация примесей.* Хроматограмма раствора для проверки пригодности хроматографической системы 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 для проверки пригодности хроматографической системы:

‒ *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.

Содержание олигомеров апротинина в процентах (Х) вычисляют по формуле:



|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где |  | – | сумма площадей пиков с относительным временем удерживания меньше 1,0 на хроматограмме испытуемого раствора; |
|  |  | – | сумма площадей всех пиков на хроматограмме испытуемого раствора. |

**Родственные примеси.** Определение проводят методом ВЭЖХ. (ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография»).

*Подвижная фаза А (ПФА)*. Около 3,52 г калия дигидрофосфата и 7,26 г динатрия гидрофосфата безводного помещают в мерную колбу вместимостью 1 л, растворяют в воде и доводят объем раствора водой до метки.

*Подвижная фаза Б (ПФБ)*. Около 3,52 г калия дигидрофосфата, 7,26 г динатрия гидрофосфата безводного и 66,07 г аммония сульфата помещают в мерную колбу вместимостью 1 л, растворяют в воде и доводят объем раствора водой до метки.

*Испытуемый раствор.* Навеску препарата, соответствующую 90000 КИЕ помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, растворяют в ПФА и доводят объём раствора ПФА до метки.

*Раствор для проверки чувствительности хроматографической системы.* В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 1,0 мл испытуемого раствора и доводят объём раствора ПФА до метки. В мерную колбу вместимостью 20 мл помещают 1,0 мл полученного раствора и доводят объём раствора ПФА до метки.

*Раствор для проверки пригодности хроматографической системы.* Содержимое виалы стандартного образца апротинина для пригодности системы растворяют в 2,0 мл ПФА.

Примечание.

Примесь С: *S*6,*S*56:*S*15,*S*39:*S*31,*S*52-Трицикло(5-оксопролил-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); (5-Оксопролил)апротинин.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 7,5 × 0,75 см, силикагель для хроматографии, сильный катионит, 10 мкм; |
| Температура колонки | 40 °С; |
| Скорость потока | 1,0 мл/мин; |
| Детектор | спектрофотометрический, 210 нм; |
| Объём пробы | 40 мкл; |

*Режим хроматографирования*

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Время, мин | ПФА, % | ПФБ, % |
| 0–21 | 92→64 | 8→36 |
| 21–30 | 64→0 | 36→100 |
| 30–31 | 0→92 | 100→8 |
| 31–40 | 92 | 8 |

Хроматографируют испытуемый раствор, раствор для проверки пригодности хроматографической системы и раствор для проверки чувствительности хроматографической системы.

*Идентификация примесей.* Хроматограмма раствора для проверки пригодности хроматографической системы используется для идентификации примеси С.

*Относительные времена удерживания соединений.* Апротинин – 1; примесь С – около 0,9.

*Пригодность хроматографической системы.* На хроматограмме раствора для проверки пригодности хроматографической системы:

‒ время удерживания *(tR)* апротинина должно быть от 17 до 20 мин;

‒ *разрешение (R)* между пиками примеси С и апротинина должно быть не менее 1,5;

‒ *фактор асимметрии* пика (*AS*) мономера апротинина должен быть не более 1,3.

На хроматограмме раствора для проверки чувствительности хроматографической системы *отношение сигнал/шум (S/N)* для пика апротинина должно быть не менее 10.

*Допустимое содержание примесей*. Содержание каждой из примесей в препарате в процентах (*Хi*) вычисляют согласно методу нормирования по формуле:



|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *Si*  | – | площадь пика каждой из примесей на хроматограмме испытуемого раствора; |
|  |  | – | сумма площадей всех пиков на хроматограмме испытуемого раствора. |

Примеси С должно быть не более 1,0 %, единичной неидентифицированной примеси – не более 0,5 %, суммы единичных неидентифицированных примесей – не более 1,0 %.

Не учитывают примеси, составляющие менее 0,1 %.

**Механические включения**. *Видимые*. В соответствии с ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

*Невидимые*. В соответствии с ОФС «Невидимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения».

**Потеря в массе при высушивании**. Не более 10,0 % (ОФС «Потеря в массе при высушивании», способ 1). Для определения используют около 0,2 г (точная навеска) препарата.

**Однородность дозирования**. В соответствии с ОФС «Однородность дозирования».

Аномальная токсичность. Субстанция должна быть нетоксичной (ОФС «Аномальная токсичность»). Тест-доза – 2707 АТрЕ или 3600 КИЕ апротинина в 0,5 мл воды для инъекций на мышь, внутривенно. Срок наблюдения 48 ч.

**Бактериальные эндотоксины**. Не более 1,166 ЕЭ на 1000 АТрЕ апротинина или не более 0,87 ЕЭ на 1000 КИЕ апротинина. (ОФС «Бактериальные эндотоксины»).

Гистамин. Не более 0,2 мкг гистамина-основания на 4060 АТрЕ апротинина или на 5400 КИЕ апротинина (ОФС «Испытание на гистамин»).

**Стерильность**. Препарат должен быть стерильным (ОФС «Стерильность»).

**Количественное определение**. Определение проводят методом спектрофотометрии (ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях»).

Метод основан на определении изменения количества *п*-нитроанилина, освобождаемого трипсином из синтетического субстрата – БАПНА в присутствии апротинина. Все растворы используют свежеприготовленными.

*Испытуемый раствор*. Точную навеску препарата, соответствующую 13300 КИЕ апротинина, 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 50 мл и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

*Раствор трипсина.* Около 5,0 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.* Около 0,109 г (точная навеска) БАПНА растворяют при 35 ± 2 °С в 10 мл диметилсульфоксида.

*Проведение анализа*

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

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | Испытуемая проба | Трипсиновая проба | Контрольная проба |
| Испытуемый раствор | 0,4 мл | – | – |
| Раствор трипсина | 0,4 мл | 0,4 мл |  |
| 0,1 М трис – гидрохлорид буферный раствор pH 7,8 | 4,0 мл | 4,4 мл | 4,8 мл |
| Содержимое пробирок быстро перемешивают и выдерживают в течение 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 в течение 15 мин 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 1 см 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 концентрацию испытуемого раствора или его количество, скорректировав одновременно объём 0,1 М трис – гидрохлорид буферного раствора pH 7,8 так, чтобы общий объём равнялся 5,0 мл.

Активность апротинина в процентах от заявленного количества (*Х*) вычисляют по формуле:



|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *A*1 | **–** | оптическая плотность испытуемой пробы; |
|  | *A*0 | **–** | оптическая плотность трипсиновой пробы; |
|  | *V1* | **–** | объем испытуемого раствора, взятый на анализ, мл; |
|  | *L* | **–** | заявленное количество КИЕ в препарате, КИЕ; |
|  | *10,4* | **–** | молярный коэффициент поглощения *п*-нитроанилина при 405 нм; |
|  | *15* | **–** | время реакции, мин; |
|  | *1330* | **–** | коэффициент пересчета единиц ингибитора протеаз в КИЕ. |

**Хранение**. В защищенном от света месте.