**Депротеинизированный  гемодериват ФС**

**крови телят,**

**cубстанция - гранулят Вводится впервые**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на депротеинизированный  гемодериват крови телят, субстанцию - гранулят, содержащую широкий спектр низкомолекулярных компонентов [сыворотки крови](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A1%D1%8B%D0%B2%D0%BE%D1%80%D0%BE%D1%82%D0%BA%D0%B0_%D0%BA%D1%80%D0%BE%D0%B2%D0%B8)  молочных  [телят](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A2%D0%B5%D0%BB%D1%91%D0%BD%D0%BE%D0%BA)  с  [молекулярной массой](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9C%D0%BE%D0%BB%D0%B5%D0%BA%D1%83%D0%BB%D1%8F%D1%80%D0%BD%D0%B0%D1%8F_%D0%BC%D0%B0%D1%81%D1%81%D0%B0)  до 5000. В состав субстанции входит комплекс нуклеотидов, аминокислот, гликопротеидов и других низкомолекулярных веществ.

В состав субстанции входят вспомогательные вещества.

ПРОИЗВОДСТВО

Депротеинизированный гемодериват крови телят представляет собой продукт очистки сыворотки крови молочных телят, который получают путем диализа крови и ультрафильтрации. Эти процессы позволяют получить комплекс низкомолекулярных соединений.

Сырье получают из хозяйств от здоровых животных, у которых отсутствуют заболевания вирусной, бактериальной, микоплазменной и прионовой этиологии, патогенные для человека.

ИСПЫТАНИЯ

**Описание.** От белого до светло-желтого цвета мелкозернистые гранулы.

# Подлинность.

# Рибозид мочевой кислоты.

# Определение проводят методом ВЭЖХ в соответствии с ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография».

# Отношение времени удерживания основного пика рибозида мочевой кислоты на хроматограмме испытуемого раствора к времени удерживания основного пика на хроматограмме стандартного раствора депротеинизированного гемодеривата крови телят должно составлять от 0,98 до 1,02.

*Подвижная фаза.* Смешивают Фосфатный буферный раствор рН 3,0 и метанол в соотношении 82 : 18.

*Испытуемый раствор.* 400 мг субстанции депротеинизированного гемодеривата крови телят переносят в мерную колбу вместимостью 10 мл, растворяют в воде для хроматографии, доводят до метки тем же растворителем и перемешивают. При необходимости экстрагируют путем обработки на ультразвуковой бане. Полученный раствор фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм.

*Стандартный раствор.*

# Депротеинизированный гемодериват крови телят стандартный образец (стандартный раствор сравнения).

# Примечание

Растворы готовят непосредственно перед использованием.

Хроматографические условия:

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка: | 200 × 4,6 мм, силикагель октадецилсилильный (С18), 5 мкм; |
| Скорость потока:  | 0,75 мл/мин |
| Температура колонки:  | 25 °С |
| Температура пробы: | 15 °С |
| Детектор:  | УФ - 293 нм |
| Объемы пробы: | 2 мкл |
| Время хроматографирования:  | 10 мин |
| Время удерживаниярибозида мочевой кислоты:  | около 5 мин |

# *Проверка пригодности хроматографической системы*: стандартный раствор.

# Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

# $- э$ффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику рибозида мочевой кислоты, не менее 4000 теоретических тарелок;

# $- ф$актор ассиметрии пика (AS) рибозида мочевой кислоты не менее 0,8 и не более 1,5;

# $-о$тносительное стандартное отклонение времени удерживания пика рибозида мочевой кислоты не более 2,0 %

# *Оценка результатов*.

Подлинность подтверждают сравнением времени удерживания пиков рибозида мочевой кислоты на хроматограммах раствора сравнения и испытуемого раствора.

# Тяжелые металлы. Не более 0,003 % (30 мкг/мл). Определение проводят в соответствии с ОФС «Тяжелые металлы» (метод 2, определение тяжелых металлов в зольном остатке органических лекарственных средств).

# *Испытуемый раствор.*

# В кварцевый тигель, содержащий 4 мл раствора 250 г/л магния сульфата в серной кислоте разведенной 9,8 %, помещают 2 г (точная навеска) испытуемого образца. Перемешивают тонкой стеклянной палочкой, постепенно нагревают до обугливания и продолжают нагревание до получения почти белого или, в крайнем случае, сероватого остатка.

# Сжигание проводят при температуре не более 800 °С. Оставляют до охлаждения, затем остаток в тигле смачивают несколькими каплями серной кислоты разведенной 9,8 %. Выпаривают до сухого остатка, вновь сжигают и оставляют до охлаждения. Общее время сжигания не должно превышать 2 ч. Остаток из тигля количественно переносят в пробирку двумя порциями хлористоводородной кислоты разведенной 7,3 %, по 5 мл каждая. Прибавляют 0,1 мл фенолфталеина раствора 0,1%, затем нейтрализуют аммиака раствором концентрированным 25 % до появления розовой окраски. Охлаждают, прибавляют уксусную кислоту ледяную до обесцвечивания раствора и прибавляют еще 0,5 мл уксусной кислоты ледяной. При необходимости фильтруют и промывают фильтр. Доводят объем раствора водой очищенной до 20 мл.

# *Эталонный (стандартный) раствор.*

# Готовят как и испытуемый раствор, используя вместо исследуемого вещества, 6 мл стандартного раствора свинец - иона (10 мкг/мл). К 10 мл полученного раствора прибавляют 2 мл испытуемого раствора.

# *Контрольный раствор.*

# Готовят так же, как испытуемый раствор, прибавляя к исследуемому веществу 6 мл стандартного раствора свинец - иона (10 мкг/мл). К 10 мл полученного раствора прибавляют 2 мл испытуемого раствора.

# *Раствор сравнения.*

# Смешивают 10 мл воды очищенной и 2 мл испытуемого раствора.

# Методика

# К 12 мл каждого из растворов (испытуемый, эталонный (стандартный), контрольный растворы и раствор сравнения), прибавляют 2 мл фосфатного буферного раствора рН 3,5 и перемешивают. К полученной смеси прибавляют по 1,2 мл тиоацетамидного реактива и немедленно перемешивают. Через 2 мин сравнивают окраску растворов визуально.

# *Пригодность системы:*

# Испытание признается недействительным, если:

# - эталонный раствор не окрашивается в светло-коричневый цвет, в сравнении с раствором сравнения;

# - окраска контрольного раствора по интенсивности не сопоставима с окраской эталонного раствора.

#  *Оценка результатов:*

# Испытуемый образец соответствует требованиям испытания, если коричневая окраска испытуемого раствора по интенсивности не превышает окраску эталонного раствора.

# Если оценить результат трудно, то растворы фильтруют через соответствующий мембранный фильтр (номинальный размер пор 0,45 мкм). Фильтрацию проводят медленно и равномерно, прилагая к поршню умеренное и постоянное давление. Сравнивают пятна на фильтрах, полученные с различными растворами.

# Вода. Не более 1,9 %. Определение содержания воды проводят методом К. Фишера в соответствии с ОФС «Определение воды».

# Масса навески образца 0,8 – 1,2 г (точная навеска).

# Микробиологическая чистота. Должен выдерживать требования по категории 1.2.Б (табл. 2) для производства стерильных лекарственных препаратов. Должен выдерживать требования по категории 3.2 (табл. 2) для производства нестерильных лекарственных препаратов согласно ОФС «Микробиологическая чистота».

# Специфическая активность. Индекс стимуляции (*μ*) $\geq $ 2,0. Определение проводят радиоизотопным методом (включение радиоактивной глюкозы в адипоциты).

# Определение биологической активности субстанции депротеинизированного гемодеривата крови телят основано на усилении липогенеза в адипоцитах, взятых у самцов крыс. Депротеинизированный гемодериват крови телят оказывает инсулиноподобное воздействие на обмен веществ (усвоение глюкозы и образование жиров). Стимуляция переноса глюкозы при образовании жиров (липогенезе) является специфической особенностью жировых клеток и данный процесс можно исследовать с помощью включения меченой радиоактивным изотопом глюкозы [D-(6-3H)-глюкоза] в изолированные адипоциты.

# Индекс стимуляции (*μ*) - отношение среднего арифметического значения количеств детектируемых меток в мин образцов испытуемого раствора к среднему арифметическому значению количеств детектируемых меток в мин образцов с водой.

# *Стандартные образцы.*

# Инсулин человеческий международный стандарт (активность 26,0 МЕ/мл).

# *Глюкозы раствор 1 М.* 19,8 г D – глюкозы - моногидрата вносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, рстворяют в 90 мл воды при перемешивании, доводят объем водой до метки, перемешивают. Приготовленный раствор порциями по 100 мкл каждая помещают в реакционные контейнеры типа "Эппендорф" вместимостью 150 – 200 мкл и замораживают. $≅$

# Раствор хранят при температуре не выше минус 18 °С не более 6 мес.

# *D-(6-3H)-глюкозы рабочий раствор (около 230 кБк/мл) (раствор радиоактивной глюкозы ).*

# 250 мкл водного раствора ($≅$ 9,25 МБк) D-(6-3H)-глюкозы с удельной активностью 0,74-1,5 ТБк/ммоль разводят глюкозы раствором 10 мМ до 40 мл.

# Раствор хранят при температуре не выше минус 18 °С не более 6 мес.

# *Основной стандартный раствор инсулина.*

# Навеску, содержащую около 800 МЕ инсулина человеческого, растворяют в 20 мл смеси вода - этанол (4 : 6) с добавлением 2 капель хлористоводородной кислоты раствором 1 М. 125 мкл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл. Доводят объем раствора до метки буферным раствором для приготовления стандартного раствора инсулина, перемешивают.

# Приготовленный раствор по 100 мкл помещают в микро - пробирки типа "Эппендорф" вместимостью 150 – 200 мкл и замораживают.

# Замороженный раствор хранят при температуре не выше минус 18 °Св течение 6 мес.

# *Буферный раствор для приготовления стандартного раствора инсулина.* 121,14 мг трис(гидроксиметил)аминометана и 1,25 мл альбумина бычьего сывороточного диализированного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 50 мл воды очищенной, доводят рН до 7,5 ± 0,05 хлористоводородной кислоты раствором 1 М (потенциометрически), доводят объем раствора водой очищенной до метки, перемешивают; замораживают порции по 1,0 мл каждая.

# Замороженный раствор хранят при температуре не выше минус 18 °Св течение 6 мес.

# *Стандартный раствор инсулина.*

# К 100 мкл основного стандартного раствора инсулина добавляют 900 мкл буферного раствора для приготовления стандартного раствора инсулина и перемешивают.

# Раствор используют свежеприготовленным.

# *Раствор коллагеназы.*

# К навеске, содержащей около 800 МЕ коллагеназы, активностью >100 МЕ/мг прибавляют 6 мл буферного раствора №3 и перемешивают.

# Раствор используют свежеприготовленным.

# *Основной испытуемый раствор.*

# 3,5 г субстанции – гранулят помещают в стеклянный стакан, прибавляют 50 мл воды и экстрагируют при комнатной температуре при перемешивании магнитной мешалкой не менее 30 мин, затем фильтруют.

# К 10,0 мл фильтрата при перемешивании прибавляют 10,0 мл трихлоруксусной кислоты раствора 30 %. Осадок отделяют фильтрованием.

# 1 мл фильтрата содержит 20 мг депротеинизированного гемодеривата крови телят в пересчете на сухое вещество.

# Основной испытуемый раствор используют свежеприготовленным.

# *Раствор для диализа.*

# 73,05 г натрия хлорида растворяют в 100 мл солевого раствора (состав солевого раствора: 3,73 г калия хлорида, 1,47 г кальция хлорида дигидрата, 5,08 г магния хлорида в 100 мл раствора) и разводят водой очищенной до 10 л.

# Раствор хранят при комнатной температуре в течение 3 мес.

# *Альбумина бычьего сывороточного диализированный раствор (БСА)*

# *Подготовка диализной трубки*

# Для диализа используют целлюлозную трубку, с размером пор 12000-14000 Да, емкостью 5,0 мл/см. Диализную трубку кипятят в натрия гидрорбоната растворе 0,5 % в течение 3 мин, промывают водой очищенной 3 раза, далее кипятят в натрия эдетата растворе 1 мМ в течение 3 мин, после чего промывают водой очищенной 5 раз.

# *Диализ альбумина бычьего сывороточного раствора.*

# Растворяют 80 г БСА, фракции V, рН 5,2 в 700 мл раствора для диализа при температуре не выше 35 °С, заполняют диализную трубку и проводят диализ в течение 2 сут при температуре 6 ± 2 °С. 4 раза проводят диализ каждый раз относительно 10 л раствора для диализа при его перемешивании магнитной мешалкой. Меняют раствор для диализа два раза в день в процессе проведения диализа.

# *Приготовление диализированного раствора БСА.*

# БСА раствор после диализа помещают в мерный цилиндр вместимостью 1000 мл, доводят объем раствора до метки водой очищенной, фильтруют через стерильный стекловолокнистый фильтр с размером пор 0,2 мкм и замораживают порции по 35 мл каждая.

# Замороженные порции раствора хранят при температуре не выше минус 18 °Св течение 6 мес.

# *Диализированная телячья сыворотка.*

# *Подготовка диализной трубки:*

# Проводят подготовку диализной трубки аналогично методике, описанной в разделе, «Альбумин бычий сывороточный диализированный раствор».

# *Приготовление* *телячьей сыворотки* д*иализированной.*

# Заполняют целлюлозную диализную трубку, с размером пор 12000-14000 Да, емкостью 5,0 мл/см, 1000 мл телячьей сывороткой, качества «новорожденный теленок» и проводят диализ в течение 3 сут при температуре (6 ± 2 ) °С. 6 раз проводят диализ каждый раз относительно 10 л раствора для диализа при его перемешивании магнитной мешалкой. Меняют раствор для диализа два раза в день в процессе проведения диализа.

# Фильтруют раствор через стекловолокнистый фильтр с размером пор 0,2 мкм и замораживают порции по 21,5 мл каждая.

# Замороженные порции раствора хранят при температуре не выше минус 18 °Св течение 6 мес.

# Примечание

# Телячья сыворотка может содержать соединения, которые могут в значительной степени влиять на результаты. По этой причине каждую новую серию диализированной сыворотки необходимо сравнивать с ранее протестированной серией путем проведения теста по изменению липогенеза (данные по качеству ранее протестированной серии). В случае больших отклонений от критериев приемки следует использовать другую серию.

# Деминерализация основного испытуемого раствора

# Основной испытуемый раствор необходимо деминерализовать с помощью сильного катионообменника, состоящего из силикагеля ковалентно-связанного с ароматической сульфокислотой.

# *Подготовка ионообменной смолы для заполнения колонки.*

# Перед использованием ионообменную смолу подготавливают следующим образом: около 250 г ионообменной смолы (SCX - сильный катионообменник) кипятят в 250 мл натрия гидроксида раствора 1 М в течение 1 ч. Смолу промывают 250 мл воды очищенной, перемешивают 10 мин при комнатной температуре (15 - 25 °С) и декантируют. Процедуру промывания повторяют пять раз.

# Затем смолу кипятят в 250 мл хлористоводородной кислоты раствора 1 М в течение 1 ч. Смеси дают отстояться и декантируют надосадочную жидкость. Смолу промывают 250 мл воды очищенной, перемешивая 10 мин при комнатной температуре (15 - 25 °С) и декантируют. Процедуру промывания повторяют пять раз.

# Пластиковую колонку с внутренним диаметром $≈$ 16 мм, объемом не менее 13 мл с выпускным клапаном и 2 отводами фриттами (с отводом и помещенной на дно фриттой) наполовину заполняют водой.

# Пипеткой добавляют около 3 мл суспендированной ионообменной смолы.

# Удаляют возникающие пузыри воздуха путем, отсасывая их подходящим способом и вносят жидкость с помощью пипетки. Помещают вторую фритту сверху на ионообменную смолу, для того чтобы предотвратить перемешивание и высыхание смолы.

# *Регенерация колонок.*

# Колонку регенерируют путем последовательного пропускания через нее 30 мл воды очищенной, 10 мл натрия гидроксида раствора 1 М, 40 мл воды очищенной, 10 мл хлористоводородной кислоты раствора 1 М и 40 мл воды очищенной.

# *Методика деминерализации*

# Деминерализуют две аликвоты основного испытуемого раствора.

# В регенерированную колонку вносят около 5 мл воды очищенной. Затем в колонку вносят 2 мл основного испытуемого раствора (концентрация депротеинизированного гемодеривата крови телят 20 мг/мл в пересчете на сухое вещество).

# Колонку с ионообменной смолой наполняют водой очищенной до 10 мл и промывают дважды, используя всего 20 мл воды.

# Проводят элюирование 10 мл аммиака раствора 1 %, собирая элюат (около 10 мл) в пластиковую пробирку. Концентрируют элюат до получения сухого остатка в вакуумном концентраторе/центрифужном испарителе при температуре не более 40 °С (10 - 16 ч).

# Критерии приемлемости

# $- р$азница между индексом стимуляции новой серии телячьей сыворотки и ранее протестированной серией не должна быть более, чем 20 % относительно среднего значения индекса стимуляции ранее протестированной и новой серий телячьей сыворотки, рассчитанного для трех повторностей.

# $- и$ндекс стимуляции инсулина должен находится между *μ* 5 и *μ* 15.

# Методика:

# Животные.

# Самцы крыс, масса тела около 140-160 г (на момент поступления).

# В течение не менее двух дней перед началом теста крысы должны находиться на специальной диете с низким содержанием жиров, состоящей из 2/3 овсяных хлопьев и 1/3 обезжиренного молока и воды для питья. Доступ к корму и воде свободный.

# Не менее двух животных переносят в операционную лабораторию, по крайней мере, за один час перед забором жировой ткани.

# Примечание.

# В это время с животными ведут себя таким образом, чтобы, не волновать их непосредственно перед забоем, поскольку в противном случае будет наблюдаться образование эндогенного инсулина, что отразится на результатах.

# 2. Вынимают из морозильника и размораживают по одному полипропиленовому реакционному контейнеру содержащему:

# - глюкозы раствор 1 М,

# - основной стандартный раствор инсулина.

# - буферный раствор для приготовления стандартного раствора инсулина,

# - альбумин бычий сывороточный раствор диализированный,

# - телячью сыворотку диализированную.

# Проводят операцию размораживания контейнеров на водяной бане с шейкером.$ $

# З. В мерную пробирку вместимостью 10 мл с притертой пробкой помещают 70 мкл глюкозы раствора 1 М, прибавляют 6,93 мл воды и перемешивают (глюкозы раствор 10 мМ).

# 4. Готовят промывочный буфер, серийный и буферный раствор 3, прибавляя в пластиковые емкости приготовленные растворы следующим образом:

# Таблица

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Наименования растворов | Промывочный буфер | Серийный буфер | Буферный раствор 3 |
| Трис-буферный раствор рН 7,4 | 5,0 мл | 4,2 мл | 500 мкл |
| Солевой раствор | 750 мкл | 630 мкл | 37,5 мкл |
| 1 М раствор натрия хлорида  | 9,4 мл | 7,9 мл | 469 мкл |
| 10 мМ раствор глюкозы  | 5,0 мл | --- | 500 мкл |
| Диализированный раствор бычьего сывороточного альбумина | 25,0 мл | --- | 6,3 мл |
| Диализированная телячья сыворотка  | --- | 21,0 мл | --- |
| Вода | 54,9 мл | 35,6 мл | 2,25 мл |
| Суммарный расчет величин | *100,05 мл* | *69,33 мл* | *10,0565 мл* |

# 5. Раствор коллагеназы, содержащий около 800 МЕ коллагеназы, в 6 мл буферного раствора 3, помещают в *β*-жидкостной сцинтилляционный счетчик.

# 6. Взвешивают животных и записывают среднюю массу. После чего животных забивают путем смещения позвонков и обескровливают. Вскрывают мошонку и извлекают эпидермальную жировую ткань и при необходимости вместе с ней жировую ткань надпочечников. Выделенную жировую ткань помещают в тарированный флакон с оставшимся буферным раствором 3 ($≈$4,0 мл, см п. 5).

# Определяют массу полученной жировой ткани (2-3 г), которую измельчают ножницами.

# 7. Для выделения адипоцитов переносят чечевицеобразные части жировой ткани в раствор коллагеназы и инкубируют на водяной бане с шейкером при температуре 37 °С и при частоте шейкера около 150 мин-1  до получения однородной жировой суспензии в течение около 1 час. Используют 2,0 мл коллагеназы раствора на грамм жировой ткани.

# 8. Для отделения расщепленных тканей клеточную суспензию фильтруют через нейлоновую сетку 250 мкм.

# 9. Клеточную суспензию промывают пятикратным объемом промывочного буфера комнатной температуры (15 - 25 °С) и перемешивают металлическим стержнем осторожными движениями вверх и вниз. Затем смесь центрифугируют (не более 30 с, и скоростью вращения не более 500 об/мин) и отделяют надосадочную жидкость. Процедуру повторяют не менее трех раз до получения концентрированной клеточной суспензии белого цвета.

# Примечание:

# Для отмеривания концентрированной клеточной суспензии пипеткой рекомендуется расширить отверстие наверху пипетки (вплоть до отрезания ее верха), отбирать пробу следует медленно.

# 10. Для каждого теста разводят 1,5 мл концентрированной клеточной суспензии промывочным буфером до 30 мл.

# Примечание:

# С этой минуты при отборе пипеткой клеточную суспензию следует поддерживать в движении, в противном случае адипоциты поднимаются кверху. Для тестирования используется верхний слой суспензии.

# 11. Смешивают 100 мкл разбавленной клеточной суспензии с 890 мкл промывочного буфера и 10 мкл акридинового оранжевого раствора 1 %. Дважды переносят с помощью стеклянной микропипетки по 5 мкл полученного раствора в счетную камеру (Неубауера), накрывают соответствующей стеклянной крышкой и проводят подсчет клеток под флюоресцентным микроскопом или с использованием устройства флюоресцентной визуализации клеток. В среднем должно обнаруживаться 100 - 150 клеток (эквивалентно 40000 - 60000 клеток на каждый тест). В случае больших отклонений доводят клеточную суспензию путем разведения промывочным буфером или путем добавления концентрированной клеточной суспензии. В результате получают необходимую клеточную суспензию.

# 12. Во время процесса переваривания проводят подготовку следующих образцов для внесения в *β*-жидкостной сцинтилляционный счетчик:

# а) Приготавливают испытуемые растворы путем соединения каждого остатка, полученного после деминерализации основного испытуемого раствора, с 400 мкл воды очищенной.

# б) Приготавливают инсулина стандартный раствор, добавляя 900 мкл буферного раствора с рН 7,5 для приготовления стандартного раствора инсулина к 100 мкл основного инсулина стандартного раствора и перемешивают.

# в) В заранее приготовленное количество флаконов для *β*-жидкостного сцинтилляционного счетчика: (макс. 96) переносят пипеткой воду очищенную, стандартный раствор инсулина, испытуемые растворы, и располагают их следующим образом относительно получаемых образцов:

# - Исходные образцы (1 - 6) содержат: по 100 мкл воды очищенной в каждом;

# - Образцы инсулина (7 - 12): по 100 мкл стандартного раствора инсулина в каждом;

# - Образцы испытуемого раствора (3 образца для каждой деминерализации): по 100 мкл испытуемого раствора в каждом.

# г) Ко всем образцам пипеткой прибавляют по 660 мкл серийного буфера.

# д) Затем к этим образцам пипеткой прибавляют по 40 мкл раствора радиоактивной глюкозы.

# е) Помещают флаконы для *β*-жидкостного сцинтилляционного счетчика на водяную баню с шейкером.

# ж) Включают водяную баню с шейкером (температура 37 °С, 150

# мин-1), прибавляют воду и подготавливают сцинтилляционный коктейль для неводных образцов.

# 13. Включают секундомер и 200 мкл верхнего слоя конечной клеточной суспензии помещают во флаконы для *β*-жидкостного сцинтилляционного счетчика, приготовленные как описано выше.

# Примечание:

# Перенос пипеткой конечной клеточной суспензии во флаконы является критической фазой эксперимента. Пипетку следует вносить во флакон вертикально и при извлечении пипетки из флакона она не должна касаться стеной флакона, поскольку, в противном случае, часть клеток останется на стенке флакона и не будет участвовать в реакции.

# После инкубирования в течение одного ч реакцию останавливают путем добавления 5 мл сцинтилляционного коктейля в каждый флакон в той же последовательности и с соблюдением того же временного интервала, что и при добавлении конечной клеточной суспензии, флаконы закрывают, встряхивают и помещают в штативы *β*-жидкостного сцинтилляционного счетчика.

# До проведения измерения количества детектируемых меток, флаконы выдерживают не менее одного ч.

# 14. Устанавливаемые параметры *β*-жидкостного сцинтилляционного счетчика:

# - количество детектируемых меток в мин (cmp - counts per minute):

#  0 – 18.6 кэВ ;

# - период измерения: максимально 20 мин или 2S %$ \leq $ 3;

# - вычитание фона: 200 cmp (коррекция внутренних эффектов).

# Результаты анализа

# С*реднее арифметическое значение количеств (*$\overline{Х}$*) детектируемых меток в мин* вычисляют по формуле:

# $\overline{Х}$=$ \frac{\sum\_{}^{}х}{n}$,

# где: $\sum\_{}^{}х$- суммарное количество детектируемых меток одного образца, мин;

# n – общее количество испытуемых флаконов с испытуемыми растворами.

# Среднее арифметическое значение двойного определения не должно отклоняться более чем на ± 20 % от общей средней величины. Если отклонение выше указанного, то проводят дополнительный тест испытуемого образца.

# Возможные случайные метки проверяют в соответствии с rm – тестом и исключают их после определения:

# *PG =*$ \frac{[X^{\*}-\overbar{X]}}{s}$

# где:  *PG -* тест количество для rm – теста;

# $Х^{\*}$ - величина предполагаемой случайной метки;

# $\overline{Х}$ - среднее арифметическое значение количеств детектируемых меток в мин;

# $S$ *-*стандартное отклонение.

# Сравнивают рассчитанное тест количество *PG* с табличным значением rm.

# rm (95,3 %) =1,153

# Если *PG* $\geq $ *1,153,* то это означает, что тест величина является случайной меткой. В этом случае ее используют для расчета и в документах отмечают ($\*)$.

# *Индекс стимуляции* (*μ)* рассчитывают по формуле:

# *Индекс стимуляции* $μ$ = $\frac{cpm\_{образца}}{cpm\_{исходн.}}$ ,

# где:$ cpm\_{образца}$- среднее арифметическое значение количеств детектируемых меток в мин образцов испытуемого раствора;

# $cpm\_{исходн.}$ - среднее арифметическое значение количеств детектируемых меток в мин образцов с водой

# Проверка пригодности системы

# Система считается пригодной, если выполняется условие:

# Индекс стимуляции инсулина $μ$инсулина должен быть от 5 до 15.

# Индекс стимуляции инсулина $μ$инсулина рассчитывают по формуле:

# *Индекс стимуляции* $μ$инсулин =$\frac{cpm\_{инсулин}}{ cpm\_{исходн.}}$ ,

# где:$ cpm\_{инсулин}$- среднее арифметическое значение количеств детектируемых меток в мин образцов стандартного раствора инсулина;

# $cpm\_{исходн.}$ - среднее арифметическое значение количеств детектируемых меток в мин образцов с водой

# Транспортирование и хранение. В защищенном от света месте, при температуре не выше 25 °С. В соответствии с ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».