**Депротеинизированный  гемодериват ФС**

**крови телят,**

**cубстанция - концентрат Вводится впервые**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на депротеинизированный  гемодериват крови телят, субстанцию - концентрат, содержащий 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.

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.** Прозрачный коричневато - желтого цвета раствор.

**Подлинность**

Для установления подлинности препарата идентифицируют аминокислоты, пептиды и рибозид мочевой кислоты**.**

**Аминокислоты.**

Определение проводят в соответствии с ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография» и ОФС «Аминокислотный анализ».

Время удерживания пиков аминокислот на хроматограммах испытуемого раствора должно соответствовать времени удерживания пиков аминокислот стандартного раствора.

*Подвижная фаза А.* 5,5 г натрия дигидрофосфата моногидрата помещают в колбу вместимостью 1000 мл и растворяют в воде очищенной. Натрия гидроксида раствором (приблизительно 10 М) корректируют рН до 7,8, доводят водой до метки 1000 мл и перемешивают.

*Подвижная фаза В.* Смешивают ацетонитрил, метанол и воду в объемном соотношении 45:45:10.

*Испытуемый раствор.*

В градуированную пробирку вместимостью 10 мл помещают 2 мл субстанции - концентрата, доводят до метки водой для хроматографии и перемешивают.

*Стандартный раствор.*

Стандартные образцы аминокислот 1 нмоль/мкл в 0,1 М хлористоводородной кислоте.

*Хроматографические условия:*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка: | 150 × 4,6 мм; силикагель ортафтальальдегид R (5 мкм) |
| Температура колонки: | 40 °С |
| Температура пробы: | 15 °С |
| Детектор | спектрофотометр УФ - 338 нм |
| Скорость потока: | 2,0 мл/мин |
| Вводимые пробы: | 100 мкл каждого из рабочих стандартов и раствора для разбавления пробы |
|  | Программа вводимых проб: |
|  | дериватизация колонки. 2,5 мкл боратного буфера прибавить 0,5 мкл образца дважды перемешать в петле, промыть иглу в воде и выждать 0,5 мин. Добавить 0,5 мкл фталевого альдегида реактив (ОФА реактив), шесть раз перемешать в петле, промыть иглу в воде прибавить 0,5 мкл реактива 9-фторенилметилхлороформата (ФМХ реактив), шесть раз перемешать в петле, затем промыть иглу в ацетонитриле. Добавить 32 мкл воды, дважды перемешать в петле, вводить в колонку. |

Градиент:

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Время/мин |  | *Подвижная фаза А*/ % |  | *Подвижная фаза* В/ % |
| 0 – 7,35  7,35 – 23,55  23,55 – 24,05  24,05 – 27,75  27,75 – 28,65  28,65 – 31,45  31,45 – 35,45 - |  | 100  100  43  0  0  100  100 |  | 0  0  57  100  100  0  0 |

**Пептиды.**

# Положительная реакция с биуретовым реактивом (сине-фиолетовое окрашивание).

К 10 мл субстанции прибавляют примерно 1 г угля активированного. Растирают в течение 3 мин и фильтруют через складчатый фильтр.

К 2 мл фильтрата добавляют 2 мл биуретового реактива и тщательно перемешивают.

В присутствии пептидов, раствор должен окраситься в сине-фиолетовый цвет.

В качестве образца сравнения используют водный раствор (вода вместо испытуемого раствора).

**Рибозид мочевой кислоты.**

Определение проводят в соответствии с ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография»

# Подлинность подтверждают сравнением времени удерживания пиков рибозида мочевой кислоты на хроматограммах раствора сравнения и испытуемого раствора. 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.* К 1 мл субстанции прибавляют 9,0 мл воды для хроматографии, при необходимости экстрагируют путем обработки на ультразвуковой бане (перемешивая). Содержимое переносят в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят объем раствора до метки тем же растворителем и перемешивают. Полученный раствор фильтруют в случае необходимости через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм.

*Стандартный образец.*

# 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 удерживания  рибозида мочевой кислоты: | около 5 мин |

# *Проверка пригодности хроматографической системы*: стандартный раствор.

# Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

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

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

# относительное стандартное отклонение времени удерживания пика рибозида мочевой кислоты не более 2,0 %.

**Прозрачность.** Субстанция должна быть прозрачной. Определение проводят в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей».

**рН.** От 6,5 до 7,5. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

**Плотность.** 1,105 - 1,120. Определение проводят в соответствии с ОФС «Плотность» Метод 1.

# Потеря в массе при высушивании. От 190 до 210 мг/мл. Определение проводят в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании» Способ 3.

*Методика*

В бюкс вначале переносят около 1,5 г прокаленного морского песка так, чтобы полностью прикрыть дно. Определяют массу тары, после чего пипеткой переносят соответствующее количество (расчетный остаток после сушки ˃ 50 мг) испытуемого образца в бюкс, взвешивают. Сушат бюкс, содержащий испытуемый образец, с открытой крышкой в сушильном шкафу при температуре 53 ± 2 °С под вакуумом в течение не менее 6 час. В шкафу накрывают бюкс крышкой, переносят в эксикатор со слоем силикагеля, охлаждают до комнатной температуры (15 - 25 °С) и взвешивают. Тест проводят дважды.

*Расчеты:*

Потерю в массе при высушивании (Х) в мг/мл вычисляют по формуле:

*,*

где: m - масса бюкса, доведенного до постоянной массы, мг;

m1 - масса бюкса с испытуемым образцом после высушивания, мг;

V - объем испытуемого образца, мл.

Определяют среднее арифметическое двух отдельных значений с точностью до ± 0,5 мг/мл

**Чистота**

1. **Оптическая плотность.** Показатель оптической плотности не более 1,0 при длине волны 420 нм. Определение проводят в соответствии с ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях».

*Испытуемый раствор.*

200 мг/мл (по сухому остатку)

Пропускают субстанцию - концентрат через фильтр со сменными фильтрующими элементами (размер пор: 0,45 мкм) и измеряют абсорбцию этого раствора при длине волны 420 нм относительно воды в качестве раствора для сравнения (в кюветах с толщиной поглощающего слоя 10 мм из стекла, кварца или пластика).

1. **Протеины.** Отрицательная реакция. Определение проводят в соответствии с ОФС «Электрофорез в полиакриламидном геле».

Электрофорез в полиакриламидном геле в невосстанавливающих условиях.

*Толщина геля:* 0,45 мм.

*Разделяющий гель:* 20 % полиакриламид.

*Буфер для образца.* Концентрированный буфер для образца SDS-PAGE.

*Испытуемый раствор.* К 100 мкл испытуемого раствора прибавляют по 80 мкл SDS/DTE буфера или (Буферный образцовый раствор (концентрированный) для электрофореза в системе натрия лаурилсульфат – полиакриламидный гель (SDS-PAGE) для восстановительных условий), подогревают на кипящей водяной бане в течение 5 мин и охлаждают до комнатной температуры. Добавляют 20 мкл йодоацетамидного раствора. Полученную смесь инкубируют в темноте при комнатной температуре в течение 60 мин. Перед использованием образовавшийся преципитат удаляют центрифугированием.

# *Основной раствор альбумина бычьего сывороточного (0,5 мг/мл)*

# Растворяют 10 мг альбумина бычьего сывороточного в натрия хлорида растворе 0,15 М и доводят до 20,0 мл тем же растворителем, перемешивают.

# *Стандартный раствор альбумина бычьего сывороточного (0,5 мг/л)*

# Разводят 10 мкл основного раствора альбумина бычьего сывороточноговодой для хроматографии до объема 10,0 мл, перемешивают.

*Контрольный раствор сравнения (стандарт альбумина).*

К 100 мкл альбумина стандартного раствора (0,5 мг/мл) добавляют по 80 мкл SDS/DTE буфера или (Буферный образцовый раствор (концентрированный) для электрофореза в системе натрия лаурилсульфат – полиакриламидный гель (SDS-PAGE) для восстановительных условий) и далее поступают как в случае с испытуемым раствором.

Перед использованием образовавшийся преципитат удаляют центрифугированием.

*Раствор калибрантов (маркеров).*  Раствор, состоящий из маркеров с известной молекулярной массой для низкомолекулярных белков, пригодный для калибровки полиакриламидных гелей в присутствии натрия лаурилсульфата.

# Маркеры с известной молекулярной массой для низкомолекулярных белков, состоящий из:

|  |  |
| --- | --- |
| Маркеры | молекулярная масса |
| - Фосфорилаза b | 94000 |
| - Альбумин бычьей сыворотки | 67000 |
| - Овальбумин | 43000 |
| - Карбонильная ангидраза | 30000 |
| - Ингибитор трипсина из соевых бобов | 20000 |
| -Лактальбумин | 14000 |
| - Сахароза | --- |

# *Концентрат маркера белка*

# Содержимое одного флакона маркера растворяют в 100 мкл воды для хроматографии, перемешивают.

Методика

*Восстановление и алкилирование раствора маркера белка*

# На определение отбирают по 20 мкл из каждого раствора концентрата маркера – калибранта и прибавляют 120 мкл SDS/DTE буфера, подогревают на кипящей водяной бане в течение 5 мин, затем охлаждают до комнатной температуры и прибавляют 20 мкл йодоацетамидного раствора. Полученную смесь инкубируют в темноте при комнатной температуре в течение 60 мин. Далее к 100 мкл смеси прибавляют 900 мкл SDS буфера.

# Общий объем смеси для каждого калибранта составляет 1 мл.

Примечание. Перед использованием удалить образовавшийся осадок центрифугированием

*Нанесение проб образцов*

Испытуемые образцы наносят с помощью аппликатора на готовый гель - носитель по 1 мкл каждого раствора: маркеры - калибранты белка, испытуемого раствора и стандартного раствора альбумина бычьего.

*Электрофорез*

В разделительный блокпомещают гель носитель, полоски буфера и аппликатор с образцами и включают прибор.

Программа:

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Сила тока | Мощность | Температура | Напряжение |
| Шаг 1:250 B | 10,0 мА | 3,00 Вт | 15 °С | 1 Вчас |
| Шаг 1:250 B | 1,0 мА | 3,00 Вт | 15 °С | 1 Вчас |
| Шаг 1:250 B | 10,0 мА | 3,00 Вт | 15 °С | 99 Вчас |

*Замечание:* Для предупреждения нарушений при проведении всех операций следует использовать одноразовые перчатки (белок с пальцев).

*Оценка результатов*

Растворы маркеров белка должны показывать 6 отдельных штрихов соответствующих известной молекулярной массы. Штрихи в случае испытуемых образцов должны быть окрашены темнее, чем штрихи стандартного раствора альбумина бычьего сывороточного с концентрацией (0,5 мкг/мл).

Примечание

Раствор SDS буфера (невостанавливающий). Растворяют 500 мг натрия лаурилсульфата, 18,6 мг натрия эдетата и 10 мл бромфенолового голубого раствора в 50 мл Трис-буферном растворе 0,2 Н рН 8,3, перемешивают.

Раствор SDS/DTE буфера (востанавливающий). Растворяют 150 мг 1,4- дитиоэритритола (ДТЭ) в 30 мл раствора SDS буфера, перемешивают.

# Тяжелые металлы. Не более 0,001 % (10 мкг/мл). Определение проводят в соответствии с ОФС «Тяжелые металлы» раздел "Определение тяжелых металлов в растворах лекарственных средств".

# *Испытуемый раствор.*

# К 1,0 мл депротеинизированного гемодеривата крови телят субстанции - концентрат добавляют 9,0 воды очищенной, перемешивают.

# *Эталонный раствор.*

# Для определения используют стандартный раствор 10 мкг/мл свинец – ионов.

# Натрий. Не более 65 мг/мл. Определение проводят одним из методов в соответствии с ОФС «Атомно-эмиссионная спектрометрия» и ОФС «Атомно-абсорбционная спектрометрия».

# Метод: *атомно-эмиссионной спектрометрии (АЭС)*

*Испытуемый раствор:* Переносят пипеткой 10 мл испытуемого образца в химический стакан вместимостью 250 мл, прибавляют 2,0 мл серной кислоты концентрированной и 2,0 мл водорода пероксида. Нагревают на песочной бане до образования дыма, охлаждают и снова нагревают до образования дыма. Повторяют эти шаги до тех пор, пока испытуемый раствор не перестанет темнеть при нагревании. Растворяют бесцветный осадок в 20 мл деионизированной воды. Прибавляют 10 мл хлористоводородной кислоты и нагревают на песочной бане до получения прозрачного раствора.

Переносят полученный раствор в мерную колбу вместимостью 100 мл и промывают стакан несколько раз деионизированной водой, добавляя в предыдущий раствор. Доводят объем раствора растворителем до 100 мл и перемешивают.

*Контрольный раствор.* Готовят аналогично испытуемому раствору с использованием 10,0 мл контрольного образца вместо испытуемого образца.

*Раствор хлористоводородной кислоты.* Разводят хлористоводородную кислоту 37 % деионизированной водой в соотношении 1:1.

*Раствор цезия хлорида.* Растворяют 6,33 г цезия хлоридав деионизированной воде и доводят объём раствора тем же растворителем до 100 мл и перемешивают.

*Эталонный раствор натрия 1 мг/мл*. Навеску натрия карбоната безводного 2,305 г растворяют в смеси 25 мл воды деионизированной и 25 мл азотной кислоты и доводят объём раствора водой деионизированной до 1 л и перемешивают.

Раствор разводят водой деионизированной в 10 раз непосредственно перед использованием.

*Эталонный раствор натрия 20 мкг/мл.* В мерную колбу вместимостью 500 мл помещают 10 мл эталонного раствора натрия 1 г/л и доводят объём раствора водой деионизированной до метки и перемешивают.

*Калибровочный раствор 1,0 мкг/мл.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 5,0 мл эталонного раствор натрия 20 мкг/мл***,*** прибавляют 10 мл раствора хлористоводородной кислоты и доводят объём раствора водой до метки и перемешивают.

*Калибровочный раствор 5,0 мкг/мл.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 25,0 мл эталонного раствор натрия 20 мкг/мл**,** прибавляют 10 мл раствора хлористоводородной кислоты и доводят объём раствора водой до метки и перемешивают.

*Калибровочный раствор 10,0 мкг/мл.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 50,0 мл эталонного раствор натрия 20 мкг/мл**,** прибавляют 10 мл раствора хлористоводородной кислоты и доводят объём раствора водой до метки и перемешивают.

*Контрольный образец.*В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 10,0 мл хлористоводородной кислоты раствора и доводят объём раствора водой до метки и перемешивают.

# *Условия детектирования* Длина волны 589,592 нм

# Лампа: лампа натриевая с полым катодом

# Горелка 5 см

# Ширина щели (мм): 1,8/0,6

# Пламя: Воздух/ацетилен

# *Пригодность системы*. Относительное стандартное отклонение отклика на калибровочный раствор 3 с содержанием натрия 10,0 мкг/млне должно превышать 5 % (6 определений)

# Метод: *Атомно-абсорбционная спектрометрия (ААС)*

# Готовят все растворы как указано в методе атомно-эмиссионной спектрометрии (АЭС).

# *Условия детектирования*

# Длина волны 589,592 нм

# Лампа: лампа натриевая с полым катодом

# Горелка 5 см

# Ширина щели (мм): 1,8/0,6

# Пламя: Воздух/ацетилен

# Калий. Не более 12 мг/мл. Определение проводят одним из методов в соответствии с ОФС «Атомно-эмиссионная спектрометрия» и ОФС «Атомно-абсорбционная спектрометрия».

# Метод: *атомно-эмиссионной спектрометрии (АЭС)*

*Испытуемый раствор:*

Переносят пипеткой 1,0 мл испытуемого образца в 250 мл химический стакан. Прибавляют 2,0 мл серной кислоты м 2,0 мл водорода пероксида. Нагревают на песочной бане до образования дыма, охлаждают и снова нагревают до образования дыма. Повторяют эти шаги до тех пор, пока испытуемый раствор не перестанет темнеть при нагревании.

Растворяют бесцветный осадок в 20 мл деионизированной воды. Прибавляют

10 мл хлористоводородной кислоты и нагревают на песочной бане до получения прозрачного раствора.

Переносят полученный раствор в мерную колбу вместимостью 100 мл и промывают стакан несколько раз деионизированной водой, добавляя в предыдущий раствор. Доводят объем раствора до 100 мл и перемешивают.

*Раствор хлористоводородной кислоты.* Разводят хлористоводородную кислоту 37 % деионизированной водой в соотношении 1:1.

*Раствор цезия хлорида.* Растворяют 6,33 г цезия хлоридав деионизированной воде и доводят объём раствора тем же растворителем до 100 мл и перемешивают.

*Эталонный раствор калия 1 мг/мл.* Навеску калия сульфата, соответствующую, 0,223 г растворяют в воде очищенной и доводят объем раствора тем же растворителем до 100,0 мл и перемешивают.

Раствор разводят водой деионизированной в 20 раз непосредственно перед использованием.

*Эталонный раствор калия 100 мкг/мл.* К 10 мл калия эталонного раствора 1 мг/мл прибавляют в мерной колбе вместимостью 100 мл воды очищенной до метки и перемешивают.

*Калибровочный раствор 3,0 мкг/л.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 3 мл эталонного раствора калия 100 мкг/мл прибавляют 10 мл хлористоводородной кислоты раствора. Доводят объем раствора деионизированной водой до метки и перемешивают.

*Калибровочный раствор 10,0 мкг/л.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 10 мл эталонного раствора калия 100 мкг/мл, прибавляют 10 мл хлористоводородной кислоты раствора. Доводят объем раствора деионизированной водой до метки и перемешивают.

*Калибровочный раствор 20,0 мкг/л.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 20 мл эталонного раствора калия 100 мкг/мл, прибавляют 10 мл хлористоводородной кислоты раствора. Доводят объем раствора деионизированной водой до метки и перемешивают.

# *Контрольный образец.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 10,0 мл хлористоводородной кислоты раствора и доводят объём раствора деионизированной водой до метки и перемешивают.

# *Условия детектирования.* Длина волны 766,490 нм

# Лампа: лампа калиевая с полым катодом

# Горелка 5 см

# Ширина щели (мм): 2,7/0,45

# Пламя: Воздух/ацетилен

# *Пригодность системы* Относительное стандартное отклонение отклика на калибровочный раствор 3 с содержанием калия 20,0 мкг/л не должно превышать 5 % (6 определений)

# Метод: Атомно-абсорбционная спектрометрия (ААС)

# Готовят все растворы как указано в методе атомно-эмиссионной спектрометрии (АЭС).

# Условия детектирования Длина волны 766.490 нм

# Лампа: лампа калиевая с полым катодом

# Горелка 5 см

# Ширина щели (мм): 2,7/0,45

# Пламя: Воздух/ацетилен

**Стерильность.** Должен быть стерильным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Стерильность» методом прямого посева.

**Бактериальные эндотоксины**. Не более 2,5 МЕ/мл. Определение проводят в соответствии с ОФС «Бактериальные эндотоксины»

Исследуемый раствор отвечает требованиям теста, если в двух пробах 2,5 МЕ/мл, ( 2,5 нг эндотоксин/мл).

# Аномальная токсичность. Должна быть нетоксичной. Для определения к 1,0 мл депротеинизированного гемодеривата крови телят субстанции концентрата прибавляют 4,0 мл воды для инъекций.

# *Тест-доза:* 0,4 мл субстанции на 1 мышь. *Скорость введения*: тест-доза/ 30 сек. *Срок наблюдения*: 72 ч.

# Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность».

# Испытания на вещества депрессорного действия. Субстанция не должна обладать депрессорным действием. Определение проводят в соответствии с ОФС «Испытание на депрессорные вещества» Вариант 1.

# Методика

К 1,0 мл субстанции - концентрата прибавляют 4,0 мл воды для инъекций.

Перед разведением субстанцию выдерживают до достижения комнатной температуры.

Раствор используют свежеприготовленным.

# *Тест-доза:* 1,35 мл полученного раствора на 1 кг массы кошки. *Скорость введения испытуемого раствора*: 1,0 мл в мин.

# Примечания

# *Подопытное животное*: Животное не следует использовать в тесте, если ему вводились растворы, которые могли повлиять на величину кровяного давления.

# После введения испытуемого раствора тест заканчивают введением стандартного образца концентрацией 1,0 мкг/мл в пересчете на гистамин-основание в объеме 0,2 мл раствора на кг массы животного. Если ответ на завершающую дозу гистамина, введенную после инъекции исследуемого раствора меньше, чем средний ответ ранее введенных низких доз гистамина, то тест признают недействительным.

# Специфическая активность. Индекс стимуляции (*μ*) 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, растворяют 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 0,1МЕ/мл.*

# 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.

# *Испытуемый раствор.*

# К 1 мл субстанции – концентрат добавляют 9 мл воды и перемешивают.

# 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 и заполняют им диализную трубку. 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 испытуемый раствор, содержащий 40 мг сухой субстанции депротеинизированного гемодеривата крови телят. Далее 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

# 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.

# 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 Наименование буферных растворов.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 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 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 % 3;

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

# Результаты анализа

# С*реднее арифметическое значение количеств () детектируемых меток в мин* вычисляют по формуле:

# =,

# где: - 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 =*

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

# - величина предполагаемой случайной метки;

# - среднее арифметическое значение количеств детектируемых меток в мин;

# *-*стандартное отклонение.

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

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

# Если *PG* 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* = ,

# где:- среднее арифметическое значение количеств детектируемых меток в мин образцов испытуемого раствора;

# - среднее арифметическое значение количеств детектируемых меток в мин образцов с водой.

# Проверка пригодности системы

# Система считается пригодной, если выполняется условие:

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

# Индекс стимуляции инсулина инсулина рассчитывают по формуле:

# *Индекс стимуляции* инсулин = ,

# где:- среднее арифметическое значение количеств детектируемых меток в мин образцов стандартного раствора инсулина;

# - среднее арифметическое значение количеств детектируемых меток в мин образцов с водой.

# Транспортирование и хранение. В защищенном от света месте, при температуре от 2 °С до 8 °С. В соответствии с ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».