МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |
| --- |
|  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Апротинин, раствор для**  **внутривенного введения** |  | **ФС** |
| **Апротинин, раствор для**  **внутривенного введения** |  |  |
| **Aprotininum, solutio pro**  **injectione intravenosa** |  | **Вводится впервые** |

|  |
| --- |
|  |

Настоящая фармакопейная статья распространяется на лекарственный препарат апротинин, раствор для внутривенного введения. Препарат должен соответствовать требованиям ОФС «Лекарственные средства для парентерального применения» и нижеприведённым требованиям.

Содержит не менее 90,0 % и не более 110,0 % от заявленного количества калликреиновых единиц на 1 мл (КИЕ/мл).

1 калликреиновая единица (КИЕ) соответствует 0,75 антитрипсиновых единиц (ATpE). 1000 калликреиновых единиц соответствуют 0,56 апротининовых единиц Европейской фармакопеи. 1 единица ингибитора протеаз (ЕИП) соответствует 1000 антитрипсиновых единиц или 1330 КИЕ.

**Описание**. Прозрачная бесцветная или слабо окрашенная жидкость.

**Подлинность**

*1.*Препарат должен обладать ингибирующей активностью по отношению к трипсину (раздел «Количественное определение»).

*2. ВЭЖХ*. Время удерживания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора должно соответствовать времени удерживания пика апротинина на хроматограмме раствора для проверки пригодности хроматографической системы (раздел «Родственные примеси. Пироглутамил-апротинин и другие»).

Прозрачность. Препарат должен быть прозрачным (ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей»).

**Цветность**. Препарат должен выдерживать сравнение с эталоном BY5 или Y5 (ОФС «Степень окраски жидкостей»).

**pH**. От 5,0 до 7,0 (ОФС «Ионометрия», метод 3).

**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».

Родственные примеси

*1. Пироглутамил-апротинин и другие.* Определение проводят методом ВЭЖХ (ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография»).

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

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

*Испытуемый раствор*. При необходимости препарат разводят подвижной фазой А до концентрации около 9000 калликреиновых единиц в 1 мл.

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

*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.

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 | 75 × 7,5 мм, силикагель для хроматографии, сильный катионит, 10 мкм; |
| Температура колонки | 40 °С; |
| Скорость потока | 1,0 мл/мин; |
| Детектор | спектрофотометрический, 210 нм; |
| Объем 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 раствор для проверки чувствительности хроматографической системы, раствор для проверки пригодности хроматографической системы и испытуемый раствор.

*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 (Rs)* между пиками примеси С и апротинина должно быть не менее 1,1;

‒ *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 (ОФС «Хроматография»):

- примесь С ‒ не более 1,0 %;

- единичная неидентифицированная примесь – не более 0,5 %

- сумма единичных неидентифицированных примесей – не более 1,0 %.

Не учитывают пики, площадь которых менее площади основного пика на хроматограмме растворадля проверки чувствительности хроматографической системы (менее 0,1 %).

***2. Олигомеры апротинина.*** Не более 1,5 %.Определение проводят методом ВЭЖХ (ОФС «Эксклюзионная хроматография»).

*Подвижная фаза (ПФ).* Ацетонитрил—уксусная кислота—вода 200:200:600.

*Испытуемый раствор.* При необходимости препарат разводят подвижной фазой до концентрации около 9000 калликреиновых единиц в 1 мл.

*Раствор для проверки пригодности хроматографической системы.* Около 30 мг субстанции апротинина 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 апротинина помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, растворяют в воде и доводят объём раствора водой до метки.

*Раствор для проверки чувствительности хроматографической системы.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 1,0 мл испытуемого раствора и доводят объём водой до метки. В мерную колбу вместимостью 20 мл помещают 3,0 мл полученного раствора и доводят объём раствора водой до метки.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | Три последовательно соединённые колонки для эксклюзионной хроматографии 300 × 7,8 мм, подходящие для разделения апротинина, его димера и олигомеров, 5-10 мкм; |
| Температура колонки | 25 °С; |
| Скорость потока | 1,0 мл/мин; |
| Детектор | спектрофотометрический, 277 нм; |
| Объём пробы | 100 мкл; |
| Время хроматографирования | 40 мин. |

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

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

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

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 (ОФС «Хроматография»).

Не учитывают пики, площадь которых составляет менее площади основного пика на хроматограмме растворадля проверки чувствительности хроматографической системы (менее 0,15 %).

Извлекаемый объем. Не менее номинального (ОФС «Извлекаемый объем лекарственных форм для парентерального применения»).

**Аномальная токсичность.** Препарат должен быть нетоксичным (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 титриметрии.

Активность апротинина определяют по ингибирующему действию, оказываемую на трипсин с известной активностью. Ингибирующую активность апротинина определяют по разнице активности трипсина в растворе без добавки апротинина и активности трипсина в растворе с добавкой апротинина. Ингибирующая активность апротинина выражается в КИЕ, 1800 КИЕ ингибируют 50 % ферментативной активности 2 мккат трипсина.

Для испытания используют реакционный сосуд вместимостью 30 мл, снабженный:

- прибором для поддержания постоянной температуры 25±0,1 °С;

- устройством для перемешивания (например, магнитная мешалка);

- крышкой с 5 отверстиями для размещения электродов, кончика титровальной бюретки, трубки для подачи азота и реагентов.

Титрование проводят автоматически или вручную, в последнем случае используют бюретку с делением 0,05 мл, рН-метр широкого диапазона измерения со стеклянным и каломельным или другими подходящими электродами.

*Испытуемый раствор.* Препарат разводят 0,0015 М боратным буферным раствором рН 8,0 до концентрации апротинина, соответствующей около 3000 КИЕ/мл.

*Раствор стандартного образца трипсина.* Готовят раствор стандартного образца трипсина, соответствующий около 0,8 мккат/мл. Для этого в мерную колбу вместимостью 20 мл помещают навеску стандартного образца трипсина, соответствующую около 16 мккат (ориентировочно 20 мг), растворяют в хлористоводородной кислоты растворе 0,001 М и доводят объём раствора тем же растворителем до метки. Раствор используют свежеприготовленным и хранят на ледяной бане.

*Раствор трипсина и апротинина.* К 4,0 мл раствора стандартного образца трипсина прибавляют 1,0 мл испытуемого раствора и сразу доводят объем раствора 0,0015 М боратным буферным раствором рН 8,0 до 40,0 мл. Выдерживают при комнатной температуре в течение 10 мин, помещают на ледяную баню и используют в течение не более 6 ч.

*Раствор трипсина разбавленный.* В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 0,5 мл раствора стандартного образца трипсина и доводят объём раствора 0,0015 М боратным буферным раствором рН 8,0 до метки. выдерживают при комнатной температуре в течение 10 мин и помещают на ледяную баню.

*Раствор субстрата.* В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 0,345 г бензоиларгинина этилового эфира гидрохлорида, растворяют в воде и доводят объём раствора водой до метки.

В ходе испытания в реакционном сосуде поддерживают постоянную атмосферу азота, перемешивание и температуру.

В реакционный сосуд помещают 9,0 мл 0,0015 М боратного буферного раствора рН 8,0 и 1,0 мл раствора субстрата, доводят значение рН до 8,00±0,05 0,1 М раствором натрия гидроксида. После достижения постоянной температуры 25±0,1 °С, прибавляют 1,0 мл раствора трипсина и апротинина и замеряют время на секундомере. рН реакционной смеси поддерживают на уровне 8,00±0,05 с помощью 0,1 М раствор натрия гидроксида и отмечают прибавленный объем каждые 30 с. Продолжают титрование в течение 6 мин. Определяют ежесекундный расход 0,1 М раствора натрия гидроксида (*n1*).

В тех же условиях титруют 1,0 мл раствора трипсина разбавленного и определяют ежесекундный расход 0,1 М раствора натрия гидроксида (*n2*).

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

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *n*1 | **–** | ежесекундный расход 0,1 М раствора натрия гидроксида, израсходованный на титрование реакционной смеси с раствором трипсина и апротинина, мл/с; |
|  | *n*2 | **–** | ежесекундный расход 0,1 М раствора натрия гидроксида, израсходованный на титрование реакционной смеси с раствором трипсина разбавленного, мл/с; |
|  | *F* |  | фактор разведения препарата; |
|  | *L* | **–** | заявленное количество КИЕ в препарате, КИЕ/мл; |
|  | *4000* | **–** | фактор пересчета активности в единицыЕвропейской фармакопеи; |
|  | *1800* | **–** | фактор пересчета единицЕвропейской фармакопеи в КИЕ. |

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