**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

**Фактор свертывания крови VIII ФС**

**человека рекомбинантный (рДНК),**

**лиофилизат для приготовления**

**раствора для внутривенного введения**

**Sanguinis coagulum factor VIII**

**humana recombinant (rDNA),**

**lyophilisate pro praeparatione**

**solutio intravenous administrationis Вводится впервые**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на препарат фактор свертывания крови VIII человека рекомбинантный (рДНК) (симоктоког альфа), лиофилизат для приготовления раствора для внутривенного введения, полученный с помощью технологии рекомбинантной ДНК из генетически модифицированных клеток эмбриональной почки человека (НЕК 293F клетки).

Препарат представляет собой высокоочищенный гликопротеиновый комплекс, состоящий из 1440 аминокислот, обладающий той же активностью, что и фактор свертывания крови VIII в плазме человека.

Фактор свертывания крови VIII человека рДНК содержит 25 потенциальных участков N - гликозилирования, 19 в В – домене тяжелой цепи, 3 – в оставшейся части тяжелой цепи с относительной молекулярной массой 90000, 3 – в легкой цепи с относительной молекулярной массой 80000 и некоторое количество одноцепочечного первичного продукта трансляции с молекулярной массой 170000.

Препарат должен соответствовать ОФС «Лиофилизаты» и нижеприведенным требованиям.

**Описание.** Содержание раздела приводится в соответствии с требованиями ОФС Лиофилизаты». Масса белого цвета, возможно наличие небольшого количества порошка белого цвета.

Восстановленный раствор - прозрачный или слегка опалесцирующий бесцветный раствор.

**Подлинность**

*Метод электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии детергента додецилсульфата натрия (SDS-PAGE).*

Расположение основных белковых полос, соответствующих молекулярной массе 80000, 90000 и 170000 на электрофореграммах испытуемого и стандартного растворов должно совпадать.

Испытание проводят в соответствии с ОФС «Электрофорез в полиакриламидном геле».

*Буфер для разведения образца концентрированный.* В мерной колбе вместимостью 50 мл растворяют 3 г трис (гидроксиметил) аминометана в 30 мл воды очищенной, устанавливают pH до 6,8 хлористоводородной кислотой, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают. Раствор хранят в течение 6 мес при температуре от 4 до 8 °С.

*Полисорбат 80 раствор 0,2 % (исходный раствор).* Растворяют 0,1 г полисорбата 80 в 50 мл воды очищенной. Раствор хранят в течение 6 мес при температуре от 4 до 8 °С.

*Буфер для разведения образца*. К 1 мл буферного раствора для разведения образца концентрированному прибавляют 0,8 мл полисорбата 80 раствора 0,2 %, 6,2 мл воды очищенной и перемешивают. Раствор готовят непосредственно перед использованием.

С*тандартные белки молекулярных масс.* Высокоочищенные рекомбинантные белки с молекулярными массами: от 10000 до 250000, 3 из которых дают полосы сравнения с молекулярными массами 25000, 50000, и 75000. При использовании стандартных белков на гелях, содержащих 7 %трис-ацетатный буфер, определяются только 6 полос, соответствующих молекулярным массам от 37000 до 250000. Белки с молекулярными массами менее 30000 мигрируют вместе с фронтом.

Растворы стандартных белков разбавляют буферным раствором в соотношении 1:10. Растворы хранят в течение 12 мес при температуре минус 20 °С.

*Испытуемый образец.* Содержимое флакона растворяют в 2,5 мл воды для инъекций. Восстановленные растворы препарата дозировкой 250 ME (концентрацией 100 МЕ/мл) и 500 ME (концентрацией 200 МЕ/мл) анализируют неразбавленными. Восстановленные растворы препарата дозировкой 1000 ME (концентрацией 400 МЕ/мл) и 2000 ME (концентрацией 800 МЕ/мл) перед анализом разбавляют до 200 МЕ/мл буфером для разбавления образцов (SDB).

*Раствор* с*тандартного образца* (используется для контроля степени окрашивания после SDS-PAGE). Перед использованием стандартный образец размораживают на водяной бане в течение 5 мин при температуре 37 °С. После размораживания раствор хранят при температуре от 15 до 25 °С не более 2 ч. Охлаждать и замораживать не допускается. Определение проводят с неразбавленным раствором стандартного образца.

*Контрольный образец*. Перед использованием контрольный образец размораживают на водяной бане в течение 5 мин при температуре 37 °С. Раствор контрольного образца хранят при температуре от 15 до 25 °С не более 2 ч. Охлаждать и замораживать не допускается.

Далее анализ проводят в соответствии с ОФС «Электрофорез в полиакриламидном геле».

Критерии приемлемости результатов анализа

- В окрашенном геле должны быть видны только полосы, относящиеся к фактору VIII. На дорожках холостого раствора не допускается присутствие инородных белков.

- Полосы стандартов белков молекулярных масс должны быть представлены в окрашенном геле узкими хорошо разделенными полосами с молекулярным массам 80000, 90000 и 170000. Возможно появление слабой полосы, соответствующей молекулярной массе белка 130000.

- контрольный образец должен давать картину полос, соответствующую фактору свертывания крови VIII человека рекомбинантному.

*Метод ВЭЖХ*

Время удерживания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора должно соответствовать времени удерживания пика мономера (± 1 мин) на хроматограмме стандартного раствора.

Определение проводят методом гель-фильтрационной (эксклюзионной) ВЭЖХ по разделу «Молекулярные параметры».

**Время растворения.** Не более 2 мин. Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Время растворения».

Препарат и растворитель (вода для инъекций) нагревают до температуры 15-25 °С. С флакона снимают защитную крышку, через резиновую пробку шприцем медленно вводят 2,5 мл растворителя и путем вращения флакона растворяют содержимое его содержимое, избегая образования пены.

Время растворения регистрируют при помощи секундомера. При необходимости контроль полученного раствора проводят в проходящем свете против черного и белого фона.

**Прозрачность** (в восстановленном препарате)**.** Раствор должен быть прозрачным или его опалесценция не должна превышать опалесценцию эталона сравнения III. Определение проводят в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей».

**Цветность** (в восстановленном препарате)**.** Раствор должен быть бесцветным или интенсивность его окраски не должна превышатьинтенсивность **о**краски эталона сравнения В7. Определение проводят в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей».

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

**Механические включения** (в восстановленном препарате).

*Видимые механические включения* должны соответствовать требованиям ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

*Невидимые механические включения* должны соответствовать требованиям ОФС «Невидимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения». Определение проводят счетно-фотометрическим методом.

**Вода.** Не более 1,5 %. Определение проводят методом кулонометрического титрования в соответствии с ОФС «Определение воды».

**Осмоляльность** (в восстановленном препарате**).** От 550 до 750 мОсм/кг. Определение проводят в соответствии с ОФС «Осмолярность» криоскопическим методом.

**Молекулярные параметры.** Площадь пика мономера должна составлять не менее 90 %, агрегатов - не более 5 %, фрагментов - не более 5 % от общей площади пиков на хроматограмме испытуемого раствора.

Определение проводят методом гель-фильтрационной (эксклюзионной) ВЭЖХ в соответствии с ОФС « Эсклюзионная хроматография».

*Подвижная фаза*: 25 мМ 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтан сульфоновой кислоты, 500 мМ натрия хлорида, 300 мМ L-аргинин монохлорид, 50 мМ кальция хлорида дигидрата, Tween-80 раствор 0,02 %, pH 7,5.

В мерной колбе вместимостью1000 мл в 800 мл воды очищенной растворяют 6,0 г 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтан сульфоновой кислоты, 29,2 г натрия хлорида, 63,2 г L-аргинина моногидрохлорида, 7,4 г кальция хлорида дигидрата и 2,0 мл Тween-80 раствора 10 %, устанавливают pH 7,5 1 М раствором натрия гидроксида, доводят объем раствора водой очищенной до метки, тщательно перемешивают и отфильтровывают через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм. Раствор хранят в течение 1 недели при температуре от 2 до 8 °С и не более 4 дней (96 ч) при температуре от 15 до 25 °С.

*Испытуемый образец.* Испытуемые образцы восстанавливают в 2,5 мл воды для инъекций и переносят во флаконы автодозатора системы ВЭЖХ не более чем за 1 ч до ввода.

*Стандарт для гель-фильтрации*, содержащий 5 мг бычьего тиреоглобулина, 5 мг бычьего гаммаглобулина, 5 мг куриного яичного альбумина, 2,5 мг лошадиного миоглобина и 0,5 мг цианокобаламина,

*Контрольный образец фактора свертывания крови VIII человека*. 1000 МЕ/мл. Контрольный образец хранят не более 5 лет при температуре минус 70 °С. Контрольный образец перед использованием размораживают на водяной бане в течение 5 мин при температуре 37 °С. Раствор хранят при температуре от 15 до 25 °С не более 1 ч. Не допускается повторное замораживание.

Размороженный контрольный образец вносят во флакон автодозатора системы ВЭЖХ и используют без дополнительной пробоподготовки.

*Подготовка колонки*

Перед использованием колонки, удаляют консервирующий этанола раствора 20 %, промывают водой для инъекций в течение 1 ч при скорости потока 0,4 мл/мин и уравновешивают подвижной фазой в течение 10 ч при скорости потока 0,25 мл/мин (более 6 объемов колонки) либо до достижения стабильности нулевой линии.

Хроматографические условия

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка для гельфильтрации | 10 х 300 мм, с размером пор 8,6 мкм |
| Температура колонки | 15 - 20°С |
| Скорость потока | 0,25 мл/мин |
| Вводимая проба | 200 мкл |
| Метод регистрации | Флуоресценция (длина волны возбуждения 280 нм, длина волны излучения 340 нм) |
| Величина спектральной щели | 18 нм (для возбуждения и излучения) |
| Максимальное давление | Около 18 бар |

Время анализа образца – 130 мин

В рамках одного анализа может быть проанализировано не более 8 образцов после четвертого и последнего образца, необходимо вводить контрольный образец. После каждого анализа колонку промывают со скоростью потока 0,3-0,4 мл/мин водой в течение 1 ч (более 1 объема колонки), 1М раствором натрия гидроксида в течение 2 ч (более 2 объемов колонки), водой в течение 2 ч (более 2 объемов колонки), 1,0 М раствором уксусной кислоты в течение 2 ч (более 2 объемов колонки), водой в течение 2 ч (более 2 объемов колонки), этанола раствором 20 % со скоростью потока 0,2 мл/мин в течение 4 ч (более 2 объемов колонки). Колонку хранят заполненной этанола раствором 20 %.

Если в течение более 1 мес анализ не проводится, колонку извлекают из системы, запечатывают и хранят при температуре от 15 до 25 °С в защищенном от прямых солнечных лучей месте.

Для всех образцов вычисляют процент относительной площади от общей площади интегрирования трех пиков: основного пика мономера (гетеродимера фактора свертывания крови VIII человеческого)рекомбинантного 80000 + 90000, пика агрегатов (элюируются до мономера) и пика фрагментов (элюируются после мономера).

Расчеты проводятся автоматически с помощью программного обеспечения для гель-хроматографии.

Для проверки системы на пригодность оценивают пик мономера на хроматограмме первого контрольного образца.

Предел количественного определения агрегатов и фрагментов - менее 2 %

*Пригодность хроматографической системы*

- пики подвижной фазы не должны накладываться на пики фактора свертывания крови VIII человека рекомбинантного.

- нулевая линия должна быть стабильна, должны отсутствовать пики площадью не менее 3 %, кроме пиков мономера, агрегатов и фрагментов.

- время удерживания пика мономера для контрольного образца должно быть от 45 до 51 мин. Разница времени удерживания для двух контрольных образцов должна быть не более ± 1 мин. Результаты, полученные для контрольного образца, должны соответствовать требованиям, указанным в сертификате анализа контрольного образца.

- эффективность хроматографической колонки *(N),* рас­считанная для пика фактора свертывания крови VIII человека рекомбинантного, должна быть не менее 800 теоретических тарелок.

**Общий белок.**

250 ME: 0,02-0,04 мг/флакон

500 ME: 0,05-0,08 мг/флакон

1000 ME: 0,10-0,15 мг/флакон

2000 ME: 0,20-0,30 мг/флакон

Определение проводят методом флуоресцентной спектроскопии.

*Испытуемый образец.* Ставят флакон на весы и обнуляют показания до 0,00000 и добавляют 1,5 мл воды очищенной. Для определения массы добавленной воды в мг взвешивают флакон с водой и записывают результат взвешивания. Препарат разводят буферным раствором для разведения. Из каждого флакона готовят 3 разведения с концентрациями в пределах линейной области от 10до30мкг/мл. Примеры приготовления рекомендуемых разведений различных дозировок препарата представлены в табл. 1. Для проведения испытаний используют 2 флакона лекарственного препарата (ЛП).

Таблица 1. Разведения препарата.

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Препарат | Разведение 1 | Разведение 2 | | | Разведение 3 |
| 250 ME | Без разведения | 1:1,3 | | | 1:1,7 |
| 600 мкл ЛП/0 мкл буфера | 450 мкл ЛП/150 мкл буфера | | | 360 мкл ЛП/240 мкл буфера |
| 500 ME | 1:1,5 | 1:1 | | | 1:2 |
| 400 мкл ЛП/200 мкл буфера | 300 мкл ЛП/300 мкл буфера | | | 200 мкл ЛП/400 мкл буфера |
| 1000 ME | 1:2 | 1:3 | | | 1:5 |
| 200 мкл ЛП/400 мкл буфера | 150 мкл ЛП/450 мкл буфера | | | 100 мкл ЛП/500 мкл буфера |
| 2000 ME | 1:5 | 1:9 | | | 1:14 |
| 100 мкл ЛП/500 мкл буфера | 60 мкл ЛП/540 мкл буфера | | | 40 мкл ЛП/560 мкл буфера |
|  |

Все подготовленные образцы (разведения) хранят не более 3 ч при температуре от 15 до 25 °С.

*Раствор стандартного образца.* Концентрация белка, определенная аминокислотным анализом, составляет около 35 мкг/мл. Раствор стандартного образца хранят при температуре минус 70 °С. Срок хранения должен быть указан на упаковке.

*Контрольный образец*. Концентрация белка около 140 мкг/мл. Контрольный образец хранят при температуре минус 70 °С. Срок хранения должен быть указан на упаковке.

*Буферный раствор для разведения.* В мерной колбе вместимостью 500 мл в 400 мл воды для инъекций растворяют 15,0 r натрия хлорида, 0,25 г кальция хлорида дигидрата, 1,0 г натрия цитрата, 4,50 г L-аргинина моногидрохлорида, 1,00 г полоксамера 188, 4,50 г сахарозы, устанавливают pH раствора до 7,0

1 М раствором натрия гидроксида, доводят объем раствора до метки водой очищенной и тщательно перемешивают. Раствор хранят не более 3 дней при температуре от 2 до 8 °С.

*Растворы стандартных образцов.* Стандартный образецразмораживают и готовят разведения согласно табл.2.

Таблица 2. Разведения стандартных образцов.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Разведение** | **Концентрация**  **(мкг/мл)** | **Стандарт**  **(мкл)** | **Буферный раствор для**  **разведения (мкл)** |
|  | 10,5 | 90 | 210 |
|  | 12,8 | 110 | 190 |
|  | 17,5 | 150 | 150 |
|  | 24,5 | 210 | 90 |
|  | 29,8 | 255 | 45 |

*Стандартный образец*. Концентрация белка, определенная аминокислотным анализом, около 35 мкг/мл. Раствор хранят при температуре минус 70 °С. Срок хранения должен быть указан на упаковке.

*Контрольный образец (КО).* Концентрация белка около 140 мкг/мл. КО хранят при температуре минус 70 °С. Срок хранения должен быть указан на упаковке. Перед определением контрольный образецразмораживают и готовят 2 независимых разведения до одной и той же концентрации, находящейся в пределах линейной области калибровочной кривой. Пример разведения представлен в табл.3.

Таблица 3. Разведения контрольных образцов

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Контрольный**  **Образец (КО)** | **Концентрация**  **(мкг/мл)** | **(мкл)** | **Буферный раствор для разведения (мкл)** | **Фактор**  **разведения** |
| КО-1, КО-2 | 20 | 43 | 258 | 7 |

В лунки 96-луночного микропланшета вносят по 250 мкл каждого образца. 5 разведений стандартного образца вносят в колонку 2 позиции А2 - Е2, 2 разведения КО (КО-1, КО-2) - в позиции А3 и В3 (согласно схеме заполнения микропланшета). В следующие далее позиции (СЗ - НЗ, затем от А4 до Н4, и т.д.) вносят испытуемые образцы. Каждое разведение образцов вносят в 2 лунки микропланшета*.*

Схема заполнения микропланшета

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Позиции | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| A |  | СО 1 | КО 1 | 2-1 | 3-2 | 4-3 | 6-1 | 7-2 | 8-3 | 10-1 | 11-2 | 12-3 |
| B |  | СО 2 | КО 2 | 2-1 | 3-2 | 4-3 | 6-1 | 7-2 | 8-3 | 10-1 | 11-2 | 12-3 |
| C |  | СО 3 | 1-1 | 2-2 | 3-3 | 5-1 | 6-2 | 7-3 | 9-1 | 10-2 | 11-3 | 13-1 |
| D |  | СО 4 | 1-1 | 2-2 | 3-3 | 5-1 | 6-2 | 7-3 | 9-1 | 10-2 | 11-3 | 13-1 |
| E |  | СО 5 | 1-2 | 2-3 | 4-1 | 5-2 | 6-3 | 8-1 | 9-2 | 10-3 | 12-1 | 13-2 |
| F |  |  | 1-2 | 2-3 | 4-1 | 5-2 | 6-3 | 8-1 | 9-2 | 10-3 | 12-1 | 13-2 |
| G |  |  | 1-3 | 3-1 | 4-2 | 5-3 | 7-1 | 8-2 | 9-3 | 11-1 | 12-2 | 13-3 |
| H |  |  | 1-3 | 3-1 | 4-2 | 5-3 | 7-1 | 8-2 | 9-3 | 11-1 | 12-2 | 13-3 |

\*В колонках с № 3 по № 12 - испытуемые образцы 1-13 с разведениями 1,2,3, например, 1-1 (образец №1, разведение 1) и т.д.

Измеряют флуоресценцию на флуоресцентном спектрофотометре со сканером микропланшетов в соответствии с инструкцией по эксплуатации прибора с использованием программного обеспечения при длине волны возбуждения 280 нм и длине волны излучения 340 нм.

*Результаты анализа*

Вычисляют результаты анализа методом линейной регрессии зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации белка. В программу вводят значения факторов разведения отдельных образцов для построения калибровочной кривой. Вычисляют среднее значение концентрации белка в каждом образце для 6 повторов.

*Критерии приемлемости результатов*

- Коэффициент корреляции линейной регрессии R2 > 0,98

- Результаты для контрольного образца должны соответствовать нормам, указанным в сертификате анализа контрольного образца.

- Относительное стандартное отклонение *(RSD)* результатов для испытуемых образцов не более 10 % (6 повторов).

**Стерильность.** Должен быть стерильным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Стерильность» методом мембранной фильтрации.

**Бактериальные эндотоксины.** Менее ЕЭ/100МЕ фактора VIII. Определение проводят в соответствии с ОФС «Бактериальные эндотоксины».

**Вирусная безопасность**

***Поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg).*** Препарат не должен содержать поверхностного антигена вируса гепатита В. Определение проводят иммуноферментным методом с использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике здравоохранения Российской Федерации и имеющих чувствительность не ниже 0,1 МЕ/мл, в соответствии с инструкциями по применению.

***Антитела к вирусу гепатита С.*** Антитела к вирусу гепатита С должны отсутствовать. Определение проводят иммуноферментным методом с использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике здравоохранения Российской Федерации и имеющих 100 % чувствительность и специфичность, в соответствии с инструкциями по применению.

***Антитела к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ-1и ВИЧ-2) и антиген р24 ВИЧ-1.*** Препарат не должен содержать антител к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ-1 и ВИЧ-2) и антиген р24 ВИЧ-1. Определение проводят иммуноферментным методом с использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике здравоохранения Российской Федерации и имеющих 100 % чувствительность и специфичность, в соответствии с инструкциями по применению.

**Аномальная токсичность** (в восстановленном препарате)**.** Должен быть не токсичным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность».

Препарат восстанавливают в 2,5 мл воды для инъекций и вводят внутрибрюшинно 1мл раствора 5 мышам и 5,0 мл 2 морским свинкам.

В течение 7 дней, начиная со дня инъекции, 2 раза в день проводят общие наблюдения за животными и записывают все клинические признаки.

Препарат соответствует требованиям, если все животные в обеих группах выживают в течение всего периода испытания и не имеют признаков ухудшения здоровья.

Если более 1 животного из каждой группы погибли, то препарат не соответствует требованиям.

**Активность фактора свертывания крови VIII человека рекомбинантного (рДНК).**

250 ME: от 200 до 313 ME фактора VIII/флакон;

500 ME: от 400 до 625 ME фактора VIII/флакон;

1000 ME: от 800 до 1250 ME фактора VIII/флакон;

2000 ME: от 1600 до 2500 ME фактора VIII/флакон.

Доверительный интервал: (Р = 0,95): 80 - 120 % от вычисленной активности.

Определение проводят методом хромогенного анализа в соответствии с ОФС «Определение активности факторов свертывания крови человека» *Хромогенный метод*

*Раствор хромогенного субстрата 2,7 ммоль/л.* Содержимое флакона (15,4 мг хромогенного субстрата N-a-Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA, 0,4 мг синтетического ингибитора тромбина и маннитола) восстанавливают в 12 мл воды для инъекций. Раствор хранят не более 3 мес при температуре от 2 до 8 °С.

*Реактив факторов.* Лиофилизированные факторы бычьей сыворотки 1Ха и X, стабилизированные бычьим альбумином, восстанавливают в 3,0 мл воды для инъекций. Реактив хранят 12 ч при температуре от 2 до 8 °С и не более 3 мес в виде аликвот при температуре не выше минус 20 °С. Размороженные аликвоты не подлежат повторному замораживанию.

*Раствор фосфолипидов.* Смесь высокоочищенных фосфолипидов с добавлением 10 мг/л ципрофлоксацина готова к использованию. Перед использованием слегка встряхивают. После вскрытия раствор хранят 3 мес при температуре от 2 до 8 °С.

*Рабочий буферный раствор (0,05 М трис pH 7,3 + 0,2 М NaCl + 10 мг/л ципрофлоксацина + 1 % БСА).* Исходный готовый буферный раствор разводят водой очищенной в соотношении 1:10. Раствор хранят в течение 24 ч с момента разведения при температуре от 2 до 8 °С.

*Плазма, дефицитная по фактору VIII (ПДФ)* (используется для предварительного разведения образцов). Вычисляют необходимое количество ПДФ для каждого анализируемого образца. За 15-30 мин до начала анализа содержимое флакона восстанавливают в 1,0 мл воды для инъекций, осторожно перемешивают и оставляют примерно на 15 мин при температуре от 15 до 25 °С до полного растворения. При анализе каждого нового образца рекомендуется использовать свежеприготовленную ПДФ. Срок хранения восстановленной плазмы: 8 ч при температуре от 2 до 8 °С.

*Испытуемый образец.* Перед проведением анализа флакон с лиофилизатом выдерживают до температуры 15 – 25 °С, удаляют крышечку, взвешивают флакон, восстанавливают содержимое флакона в 2,5 мл воды для инъекций, взвешивают флакон с раствором, определяют массу добавленной воды для инъекций, осторожно перемешивают, несколько раз переворачивая флакон, перед разведением оставляют на 15 мин при температуре от 15 до 25 °С. Раствор хранят в течение 3 ч при температуре от 15 до 25 °С во флаконе.

Для повторного анализа новые разведения восстановленного препарата готовят не позднее 2 ч после восстановления. Непосредственно перед анализом готовят предварительные разведения препарата свежевосстановленной ПДФ до ожидаемой активности около 1 МЕ/мл в два этапа согласно схеме разведения образцов:

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Препарат,  МЕ/флакон | Ожидаемое  значение,  МЕ/мл | Образец | Объем,  мкл | ПДФ,  мкл | Разведение | Общее  Разведение |
| 250 | 100 | Восстановленный  раствор  препарата | 25 | 225 | 10 |  |
| Разведение 1 | 50 | 450 | 10 | 100 |
| 500 | 200 | Восстановленный  раствор  препарата | 25 | 225 | 10 |  |
| Разведение 1 | 25 | 475 | 20 | 200 |
| 1000 | 400 | Восстановленный  раствор  препарата | 25 | 225 | 10 |  |
| Разведение 1 | 25 | 975 | 40 | 400 |
| 2000 | 800 | Восстановленный  раствор  препарата | 25 | 475 | 20 |  |
| Разведение 1 | 25 | 975 | 40 | 800 |
|  |  |

Подготовку/разведение следующего испытуемого образца начинают примерно за 20 - 30 мин до окончания предыдущего анализа.

*Раствор стандартного образца (СО)*. Перед использованием температуру раствора стандартного образца доводят до 15-25 °С и добавляют 1,00 мл воды для инъекций. Взвешивают флакон и определяют массу добавленной воды для инъекций. Если масса менее 0,995 г, добавляют больше воды для инъекций, если более 1,005 г, все результаты расчета активности образцов в данном анализе соответственно корректируются. Осторожно перемешивают до полного растворения содержимого флакона, переносят раствор в полипропиленовую пробирку и хранят ее на льду. Используют непосредственно после восстановления.

Предварительное разведение до 1 МЕ/мл. Для получения разведения 1:10,4 к 100 мкл восстановленного раствора стандартного образца добавляют 940 мкл ПДФ. Используют для калибровки коагулометр сразу после приготовления.

*Контрольный образец* *(КО).* Непосредственно перед использованием размораживают аликвоту контрольного образца при температуре 37 °С в течение примерно 5 мин, доводят до температуры 15-25 °С, гомогенизируют на вихревом смесителе в течение 1-3 сек иготовят предварительное разведение 1:15 в ПДФ до концентрации 1 МЕ/мл в полипропиленовой пробирке (50 мкл КО + 700 мкл ПДФ). Контрольный образец не подлежит повторному замораживанию. Контрольный образец анализируют в начале каждого анализа для подтверждения калибровки и в конце - для проверки годности реактивов и сертификации калибровки, при этом каждый раз размораживают новую аликвоту контрольного образца.

Включение и подготовку коагулометра проводят в соответствии с руководством по эксплуатации прибора.

Рассчитывают количество необходимых для проведения анализа реактивов из готового набора, готовят их во флаконах, входящих в комплект коагулометра и загружают в прибор согласно инструкции по использованию.

Во флакон с раствором фосфолипидов помещают магнитную мешалку.

*Калибровка коагулометра*

Калибровку прибора проводят один раз в день или перед началом каждого нового исследования. Калибровочную зависимость строят в автоматическом режиме в соответствии с инструкцией к прибору в диапазоне от 0,2 до 1,2 МЕ/мл, используя постоянный объем 5 мкл раствора стандартного образца, дополнительно разведенного рабочим буферным раствором непосредственно в коагулометре. Для калибровки используют следующие разведения раствора стандартного образца из предварительного разведения, содержащего 1 МЕ/мл: 1:10, 1:12, 1:24, 1:48, 1:60. Разведение 1:12 необходимо принимать за активность 1,0 МЕ/мл, полученные независимые разведения раствора стандартного образца соответственно принимают за активность 1,2 МЕ/мл, 1,0 МЕ/мл, 0,5 МЕ/мл, 0,25 МЕ/мл и 0,2 МЕ/мл.

Каждое разведение анализируют дважды. Программное обеспечение прибора рассчитывает результат и строит линейную калибровочную зависимость в координатах активность фактора VIII (МЕ/мл) по оси X: изменение поглощения ДмА/мин по оси Y.

*Проведение анализа*

В начале и в конце каждого исследования проводят анализ одного контрольного образца, предварительно разведенного ПДФ до 1 МЕ/мл.

Каждое предварительное разведение испытуемого образца (1 МЕ/мл) анализируют дважды в трех последовательных независимых разведениях рабочим буферным раствором (1:12;1:24;1:48), автоматически подготовленных в коагулометре непосредственно перед измерением.

При каждом измерении коагулометр фиксирует индивидуальное значение изменения оптической плотности ДмА/мин каждого предварительного разведения образца, а программное обеспечение автоматически рассчитывает активность фактора VIII по результатам последней калибровки.

Количество измерений и число предварительных разведений образца препарата приведены в таблице.

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Содержание фактора VIII во флаконе, ME | Ожидаемая концетрация фактора VIII, МЕ/мл | Кол-во  флаконов | Кол-во  анализов | Кол-во повторов из одного флакона | Кол-во утвержденных повторов из одного флакона |
| *250* | *100* | 3 | 3 | 5 | 3 |
| *500* | *200* | 3 | 3 | 5 | 3 |
| *1000* | *400* | 3 | 3 | 5 | 3 |
| *2000* | *800* | 3 | 3 | 5 | 3 |

Анализируемые образцы помещают в коагулометр согласно инструкции к прибору.

**Параметры измерений**

Время анализа: 90 сек;

Скорость анализа: 840 об/мин;

Смешивание: 15 сек, предельно интенсивное, три вращения в

двух направлениях;

Длина волны: 405 нм;

Первичная оптическая плотность: 131-160 мА (высокая чувствительность);

Количество повторов: 2 (калибровка, образец и КО);

Допустимый коэффициент вариации: 15 %

Объединение исходных значений: среднеарифметическое;

Коэффициенты разведения: 12/24/48;

Среда разведения: Рабочий буферный раствор Coatest;

Метод оценки: Изменение оптической плотности в мин;

Время старта: 20 сек

Время остановки: 80 сек;

Коэффициент корреляции: 0,995

Последовательность внесения реактивов:

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| № | Канал реактивов | Канал образцов | Внесение в кювету | Объем, мкл |
| 1 | Обычная промывка по окончании  Воздух  0,025 М раствор СаCL2 |  | Медленно в центральную | 20  50 |
| 2 |  | Обычная промывка по окончании  Воздух  Рабочий буферный раствор  Предварительно разведенный образец | Медленно во внешнюю | 20  45  5 |
| 3 | Интенсивная промывка по окончании  Воздух  Фосфолипиды |  | Медленно во внутреннюю | 20  17 |
| 4 | Обычная промывка по окончании  Воздух  Реактив факторов  Инкубация 290-300 сек |  | Медленно во внутреннюю | 20  83 |
| 5 | Обычная промывка по окончании  Воздух  Хромогенный субстрат |  | Медленно в центральную | 20  100 |

\*Прибор автоматически дополнительно разводит образцы в зависимости от заданного коэффициента разведения.

Программа обеспечения коагулометра проводит расчет результатов для всех разведений по калибровочной кривой в диапазоне 0,2 -1,2 МЕ/мл.

Результаты не менее 2-х из 3-х разведений должны находиться в пределах калибровки. Результаты, выходящие за калибровочные пределы, не учитываются. Результаты анализа 2-х из 3-х разведений не должны различаться более чем на 15 %. Для проверки выполнения этого требования наивысшее значение активности фактора VIII из всех трех разведений умножают на 0,85. Если результаты двух других разведений не различаются более чем на 15 %, регистрируют средний результат для 3 разведений. Если данный критерий не выполняется, следуют указанному ниже алгоритму. Сравнивают только последовательные разведения, не следует сравнивать разведения 1:12 и 1:48. Схема расчетов и регистрации результатов для отдельных образцов/предварительных разведений образцов.

Расчет активности и относительного стандартного отклонения (RSD) проводят с помощью программы Excel по результатам определения активности в 5 предварительных разведениях анализируемого образца.

Активность препарата, МЕ/мл = Измеренная активность х Df х F, где:

Df - коэффициент разведения для предварительных разведений (12/24/48);

F - коэффициент пересчета, используемый в случае, когда количество

добавленной в калибратор воды превышает 0,5 %.

Вычисление коэффициента пересчета проводят по формуле:

F =

Активность препарата вычисляют как среднее значение не менее 9 из 15 результатов, соответствующих критериям приемлемости.

*Критерии оценки результатов анализа*

- Коэффициент корреляции калибровочной зависимости > 0,995

- Результаты испытаний КО в каждом анализе должны находиться в пределах норм, указанных в сертификате анализа КО

- Подтверждение результатов для не менее 3-х из 5-ти предварительных разведений/повторов

- Относительное стандартное отклонение (RSD) результатов всех анализов не должно превышать 15 %

**Удельная активность.** От 6000 до 13000 ME фактора VIII/мг белка.

Величина расчетная, как отношение результата определения показателя «Активность фактора VIII» к результату определения показателя «Общий белок» для соответствующей дозировки препарата.

**Цитрат. О**т 0,6 до 0,9 мг/мл восстановленного раствора.

Определение проводят методом ионообменной ВЭЖХ в соответствии с ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография высокого давления».

*Подвижная фаза.* 5 % раствор ацетонитрила в 0,005 М растворе серной кислоты. К 5 мл ацетонитрила прибавляют 95 мл 0,005 М раствора серной кислоты. Раствор хранят при температуре от 2 до 8 °С в течение 1 мес. Перед использованием подвижную фазу фильтруют через фильтр с размером пор 0,45 мкм и дегазируют гелием в течение 10 мин или используют встроенный в хроматограф дегазатор.

*Испытуемый раствор.* Содержимое флакона с препаратом восстанавливают в 2,5 мл воды для инъекций.

*Раствор стандартного образца.10 ммоль/л (СО).* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают точную навеску 294,10 мг тринатрия цитрата дигидрата, доводят объем раствора до метки водой очищенной и перемешивают. Раствор хранят в течение 1 мес при температуре от 2 до 8 °С или не более 5 лет в криофлаконах по 2 мл при температуре минус 70 °С.

Около 600 мкл стандартного раствора вносят пипеткой во флакон автосамплера.

*Контрольный образец (КО).* Перед использованием раствор размораживают, фильтруют через одноразовый мембранный фильтр из гидрофильного полипропилена с диаметром пор 0,45 и вносят во флаконы автосамплера. КО вводят при каждом анализе для контроля.

Все подготовленные образцы (растворы) хранят не более 3 ч при температуре от 15 до 25 °С.

Перед анализом колонку уравновешивают подвижной фазой в течение не менее 6 ч.

Условия хроматографирования

Колонка 300 х 7,8 мм сульфированный сополимер стирола и дивинилбензола, размер частиц менее 10 мкм

Температура колонки 25 °С

Скорость: 0,5 мл/мин;

Вводимый объем: 10 мкл;

Детектор: спектрофотометрический, 215 нм;

Длительность анализа: 20 мин

Последовательность вводов испытуемых образцов представлена в таблице.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Флакон автосамплера | Образец | Количество вводов из 1 флакона |
| 1 | Подвижная фаза | 2 |
| 2 | СО | 1 |
| 2 | СО | 1 |
| 2 | СО | 1 |
| 2 | СО | 1 |
| 2 | СО | 1 |
| 2 | СО | 1 |
| 3 | КО | 1 |
| 4 | Испытуемый раствор | 1 |
| 5 | Испытуемый раствор | 1 |
| 6 | Испытуемый раствор | 1 |
| 3 | КО | 1 |
| 1 | Подвижная фаза | 2 |

Содержание цитрата в испытуемых образцах вычисляют по формуле:

C = ,

где: S - площадь пика цитрата на хроматограмме испытуемого раствора;

Sо - среднее значение площади пика цитрата на хроматограммах раствора стандартного образца;

Cо - концентрация раствора стандартного образца тринатрия цитрата дигидрата, мг/мл;

0,653 - коэффициент пересчета тринатрия цитрата дигидрата на цитрат (192,1/294,1; молекулярная масса тринатрия цитрата дигидрата (г/моль)/молекулярная масса цитрата (г/моль).

*Критерии приемлемости результатов анализа*

- время удерживания пика цитрата: около 10 ± 0,5 мин

- относительное стандартное отклонение (RSD) площади пика цитрата на хроматограмме раствора стандартного образца должно быть не более 5 % (для 6 определений)

- фактор асимметрии (Аs) пика цитрата должен быть в пределах от 0,8 до 1,5

- эффективность хроматографической колонки (N), рассчитанная по пику цитрата должна быть не менее 2000 теоретических тарелок.

Содержание цитрата в КО должно соответствовать нормам, указанным в сертификате анализа КО.

**Сахароза.** От 4,3 до 6,5 мг/мл в восстановленном растворе. Определение проводят методом ВЭЖХ в соответствии с ОФС «Высоэффективная жидкостная хроматография высокого давления».

Подвижная фаза. 0,16 М раствор натрия гидроксида. К 2000 мл свежеприготовленной и дегазированной гелием в течение 15 мин воде очищенной с помощью специально откалиброванного дозатора прибавляют 17 мл натрия гидроксида раствора 50 %, перемешивают и дегазируют в течение 10 мин. Раствор используют в течение 72 ч после приготовления при хранении в условиях дегазации под давлением.

Растворитель. Полисорбата 80 раствор 0,1 %. 100 мг полисорбата 80 растворяют в 100 мл воды очищенной. Раствор хранят в течение 1 мес. При температуре от 2 до 8°С.

Испытуемый раствор (50 мкг/мл сахарозы, 50 мкг/мл трегалозы). Испытуемый образец восстанавливают в 2,5 мл воды для инъекций. К 25 мкл восстановленного образца добавляют 25 мкл исходного раствора внутреннего стандарта (ВС) и 4950 мкл воды очищенной (разведение в 200 раз). Раствор хранят в течение 3 ч при температуре от15 до 25 °С.

*Исходный раствор сахарозы 10 мг/мл (СО).* В мерной колбе вместимостью 20 мл растворяют 0,2 г сахарозы в 10 мл воды очищенной и доводят этим же растворителем до метки. Раствор хранят в течение 1 мес при температуре от 2 до 8 °С.

*Исходный раствор внутреннего стандарта 10 мг/мл (ВС).* В мерной колбе вместимостью 20 мл растворяют0,2 г трегалозы в 10 мл воды очищенной, доводят объем раствора этим же растворителем до метки и перемешивают. Раствор хранят в течение 1 мес при температуре от 2 до 8 °С.

*Раствор стандартного образца (СО)* (*50 мкг/мл сахарозы, 50 мкг/мл трегалозы).* К 25 мкл СО добавляют 25 мкл ВС и 4950 мкл воды очищенной (разведение в 200 раз). Раствор хранят в автодозаторе не более 4 дней при температуре от 15 до 25 °С.

*Раствор контрольного образца (КО) (50 мкг/мл сахарозы, 50 мкг/мл трегалозы).* КО восстанавливают в 10 мл растворителя. К 25 мкл восстановленного КО добавляют 25 мкл ВС и 4950 мкл воды очищенной (разведение в 200 раз). Раствор хранят не более 3 ч при температуре от 15 до 25 °С.

*Условия хроматографирования*

Колонка 4 х 250 мм анионноообменная, состоящая из непористых шариков диаметром 10 мкм, покрытых тонким латексом функционализированной смолы

Предколонка 4 х 50 мм анионноообменная

Колонка для

улавливания бората 4 х 50 мм

Температура от 15 до 25 °С

Вводимый объем 10 мкл

Скорость потока 1,0 мл/мин

Время анализа 18 мин

Детектор Импульсный электрохимический амперометрический

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Время, сек | Потенциал (В) |  |
| 0,000 | 0,100 |  |
| 0,200 | 0,100 | Начало детектирования |
| 0,400 | 0,100 | Окончание детектирования |
| 0,410 | -2,000 | Восстановление |
| 0,420 | -2,000 |
| 0,430 | -0,600 | Окисление |
| 0,440 | - 0,100 | Восстановление |
| 0.500 | - 0,100 |

Перед проведением анализа испытуемые образцы и раствор стандартного образца фильтруют через шприц-фильтр с размером пор 0,45 мкм во флаконы автодозатора и вводят в колонку в следующей последовательности: воду очищенную для проверки стабильности базовой линии, затем раствор стандартного образца, испытуемый образец.

Время удерживания: сахарозы около 7 мин,

трегалозы около 3 мин

*Пригодность хроматографической системы.* На хроматограмме раствора стандартного образца сахарозы:

- относительное стандартное отклонение (RSD) площадей пиков на хроматограмме раствора стандартного образца должно быть не более 5 % (для 6 определений)

- фактор асимметрии (Аs) пиков должен быть в пределах от 0,8 до 1,5

- эффективность хроматографической колонки (N), рассчитанная по пику сахарозы должна быть не менее 2000 числа теоретических тарелок

- времена удерживания пиков сахарозы и трегалозы на хроматограмме испытуемого раствора не должны отличаться более чем на 5 % от времени удерживания соответствующих пиков на хроматограмме раствора стандартного образца.

Среднее значение коэффициента отклика (СF) для 6 определений раствора стандартного образца вычисляют по формуле:

СF =

где:Sc – среднее значение площади пика раствора стандарта сахарозы на хроматограмме раствора стандартного образца;

St - среднее значение площади пика внутреннего стандарта трегалозы на хроматограмме раствора стандартного образца;

Cc - концентрация сахарозы в стандартном растворе, мкг/мл;

Ct – концентрация трегалозы в стандартном растворе, мкг/мл;

Концентрацию сахарозы в исследуемых образцах (X) в мг/мл вычисляют по формуле:

Х =

Sc – площадь пика сахарозы на хроматограмме испытуемого раствора;

Ct - концентрация трегалозы в испытуемом растворе,мкг/мл;

D – коэффициент разведения;

St –площадь пика трегалозы в испытуемом растворе, мкг/мл;

CF – коэффициент отклика.

**Полоксамер 188.** От 1,0 до 1,4 мг/мл восстановленного раствора. Определение проводят методом ВЭЖХ в соответствии с ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография».

Подвижная фаза А (трифторуксусная кислота раствор 0,1 % в метаноле растворе 60 %). 1 млтрифторуксусной кислоты разводят в 600 мл метанола, добавляют 400 мл воды очищенной и перемешивают. Раствор хранят в течение 1 мес при температуре от 15 до 25 °С.

*Подвижная фаза В (*трифторуксусная кислота раствор 0,1 % *в ацетонитриле 75 %)* 1 мл трифторуксусной кислоты разводят в 1000 мл *ацетонитрила 75 %.* Раствор хранят в течение 1 мес при температуре от 15 до 25 °С.

*Испытуемый образец.* Восстанавливают содержимое флакона в 2,5 мл воды для инъекций. Раствор хранят не более 3 ч при температуре от 15 до 25 °С.

Непосредственно перед вводом в хроматографическую систему 100 мкл восстановленного раствора разводят в 500 мкл воды очищенной и тщательно перемешивают. Для каждого анализа готовят 2 разведения. Во флаконах для ВЭЖХ вместимостью 2 мл к 100 мкл раствора, полученного после разведения восстановленного раствора, добавляют 900 мкл подвижной фазы В и тщательно перемешивают.

*Исходный раствор стандартного образца полоксамера 188 (1,2 мг/мл).*Точную навеску 120 мг Полоксамера 188 переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл доводят объем до метки ацетонитрилом и перемешивают. Раствор хранят в течение 1 г при температуре от 4 до 8 °С.

*Стандартный раствор.* Непосредственно перед вводом в хроматографическую систему из исходного раствора стандартного образца в соответствии с приведённой ниже таблицей готовят 2 набора растворов стандарта Полоксамера 188.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Раствор | Объём исходного раствора стандарта, мкл | Объём воды очищенной, мкл | Концентрация раствора стандарта, мг/мл |
| С-1 | 50 | 550 | 0,10 |
| С-2 | 80 | 520 | 0,16 |
| С-3 | 100 | 500 | 0,20 |
| С-4 | 120 | 480 | 0,24 |
| С-5 | 150 | 450 | 0,30 |

Во флаконах для ВЭЖХ вместимостью 2 мл к 100 мкл растворов стандарта С-1, С-2, С-3, С-4 и С-5, добавляют 900 мкл подвижной фазы В и тщательно перемешивают. Получают соответственно стандартные растворы Cl, С2, СЗ, С4 и С.5.

*Контрольный образец* (КО). КО размораживают при температуре не более 37 °С и хранят не более 3 ч при температуре от 15 до 25 °С.

Для каждого анализа готовят 2 разведения КО. Непосредственно перед вводом в хроматографическую систему 100 мкл КО разводят в 500 мкл водой очищенной и тщательно перемешивают. К 100 мкл полученного раствора КО во флаконах для ВЭЖХ вместимостью 2 мл добавляют 900 мкл подвижной фазы В и тщательно перемешивают.

В течение не менее 15 мин колонку уравновешивают подвижной фазой В при скорости потока 1 мл/мин. Перед каждым вводом колонку промывают в течение 2 мин подвижной фазой В.

Ниже приведен пример последовательности ввода для 3-х образцов разных серий

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| № ввода | Название | Тип | Положение флакона | Вводимый объем (мкл) | Коэффициент разведения |
| 1 | Холостой | неизвестен | RA1 | 50 | 1 |
| 2-6 | С1 –С5, набор 1 | стандарт | RB1-RB5 | 50 | 1 |
| 7 | КО, разведение 1 | неизвестен | RA7 | 50 | 6 |
| 8 | КО, разведение 2 | неизвестен | RA8 | 50 | 6 |
| 9 | Образец 1, разведение 1 | неизвестен | RD1 | 50 | 6 |
| 10 | Образец 2, разведение 1 | неизвестен | RD2 | 50 | 6 |
| 11 | Образец 3, разведение 1 | неизвестен | RD3 | 50 | 6 |
| 12-16 | С1-С5, набор 2 | неизвестен | RC1-RC5 | 50 | 1 |
| 17 | КО, разведение 1 | неизвестен | RA7 | 50 | 6 |
| 18 | КО, разведение 2 | неизвестен | RA8 | 50 | 6 |
| 19 | Образец 1, разведение 1 | неизвестен | RE1 | 50 | 6 |
| 20 | Образец 2, разведение 1 | неизвестен | RE2 | 50 | 6 |
| 21 | Образец 3, разведение 1 | неизвестен | RE3 | 50 | 6 |
| 22 | КО, разведение 1 | неизвестен | RA7 | 50 | 6 |
| 23 | КО, разведение 2 | неизвестен | RA8 | 50 | 6 |
| 24 | Холостой | неизвестен | RA1 | 50 | 1 |

**Условия хроматографии**

Колонка: 4,6 х 50 мм, силикагель алкиламидный для хроматографии, 3 мкм

1,0 мл/мин

45 °С

75 °С

50 мкл

60 °С

15-25 °С

1,2 л/мин

150 бар

Скорость потока:

Температура колонки:

Температура распылителя:

Вводимый объём:

Температура испарения:

Температура образца:

Газовый поток (азот):

Макс. давление в колонке:

Подвижная фаза: А -А

В - В

Градиентный анализ

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Время, мин | А, % | В, % |
| 0 | 0 | 100 |
| 0,2 | 0 | 100 |
| 1 | 5 | 95 |
| 3 | 55 | 45 |
| 5 | 55 | 45 |

Время анализа 5 мин

При построении калибровочной кривой можно исключить не более 2 из 10 точек концентрации, но не более одной для каждой концентрации.

Программное обеспечение автоматически рассчитывает концентрации каждого образца по концентрации разведённого образца, полученной по калибровочной кривой и коэффициенту разведения.

Время удерживания пика полоксамера 3±0,2 мин; по сравнению с раствором стандартного образца.

Пригодность хроматографической системы

- фактор асимметрии пика (As) полоксамера должен быть в диапазоне от 0,8 до 1,5;

- относительное стандартное отклонение (RSD) площади пика полоксамера на хроматограмме контрольного образца должно быть не более 5 % (3 определения);

- средний результат определения содержания Полоксамера 188 в КО должен соответствовать нормам, указанным в сертификате анализа КО (3 ввода);

- отношение S/N для разведения стандарта С1 (0,10 мг/мл) должно быть не менее 10;

- разделение пика Полоксамера и предыдущего основного пика должно быть не менее 2,0;

- эффективность хроматографической колонки (N), рассчитанная по пику полоксамера должна составлять не менее 10000 числа теоретических тарелок.

**Натрий.** От 6,4 до 8,0 мг/мл в восстановленном растворе.

Определение проводят методом атомно-эмиссионной спектрофотометрии в соответствии с ОФС «Атомно – эмиссионная спектрометрия».

Растворитель/внутренний стандарт: Концентрат стандарта лития для пламенной фотометрии 3 ммоль (используют неразведенным) или стандарт цезия, 1,5 ммоль. Срок хранения вскрытого флакона: не более 3 мес при температуре от 15 до 25 °С.

*Испытуемый образец.* Восстанавливают содержимое флакона в 2,5 мл воды для инъекций. Раствор хранят не более 3 ч при температуре от 15 до 25 °С. Перед анализом готовят два разведения (1 объем восстановленного раствора препарата + 2 объема воды очищенной). Непосредственно перед вводом в фотометр образцы дополнительно разводят растворителем в соотношении 1:200.

Стандартные образцы калибровки для пламенной фотометрии с концентрацией натрия 140 ммоль/л и калия 5 ммоль/л. Срок хранения флаконов: в соответствии с указаниями производителя.

Контрольный образец с низкой концентрацией около 72,7 ммоль/л натрия. Срок хранения: не более 5 лет при температуре не выше минус 70 °С. Анализ проводят один раз в каждой серии определений.

Контрольный образец с высокой концентрацией. 160 ммоль/л натрия, 8 ммоль/л калия. Срок хранения вскрытого флакона: не более 3 мес при температуре от 15 до 25 °С.

*Контрольный образец (КО).* КО размораживают при температуре не более 37 °С и доводят до температуры 15-25°С. Раствор хранят не более 3 ч при температуре от 15 до 25 °С.

*Стандарт калибровки.* Непосредственно перед проведением испытания стандарт калибровки разводят растворителем в соотношении 1:200.

Определение натрия проводят с использованием пламенного фотометра разных моделей при длине волны 589 нм с автоматическим разведением стандартных образцов калибровки и испытуемого раствора по методикам (1,2) приведенным ниже*.* Возможно определение натрия с использованием других подходящих валидированных методик.

Методика 1

Подготавливают прибор для анализа, в соответствии с руководством по эксплуатации.

С помощью автоматического устройства для разведения или вручную вводят в пламя образцы разведенного стандарта и получают результат в ммоль/л. Перед анализом первого образца прибор калибруют с помощью стандарта калибровки. Стандарт калибровки также анализируют после каждых 5 испытуемых образцов (15 измерений) и в конце каждой серии измерений.

Все разведения испытуемых и стандартных образцов анализируют трижды.

Пример последовательности анализа:

Калибровка прибора:стандарт калибровки; КО с низкой концентрацией;

Образец 1; Образец 2 разведение 1; Образец 2 разведение 2;образец 3 разведение 1;Стандарт калибровки - подтверждение результатов;

Образец 3 разведение 2; Образец 4- высокая концентрация; Образец 4 разведение 1; Образец 4 разведение 2; Образец 5; Стандарт калибровки - Проверка нуля прибора.

Калибровка прибора: стандарт калибровки; КО с низкой концентрацией; Образец 3 разведение 2;Образец 4 разведение 1;Образец 4 разведение 2;

Образец 5;Стандарт калибровки - подтверждение результатов.

**Методика 2**

Готовят прибор для анализа в соответствии с руководством по эксплуатации. Все разведения стандартов и образцов анализируют трижды.

В прибор вносят 100 мкл стандарта калибровки в кювету в позиции Са1 (калибровка) и 100 мкл воды очищенной в кювету в позиции Zero.

В каждую кювету вносят пипеткой по 100 мкл исследуемых образцов. Сначала анализируют стандарт калибровки для подтверждения правильности калибровки. Для подтверждения стабильности работы прибора анализ стандарта калибровки автоматически повторяется между позициями 16 и 17 и в конце каждой серии определений. КО с высокой концентрацией также анализируют после автоматической повторной калибровки.

Примеры анализа

Для 2 образцов Для 5 образцов

|  |  |
| --- | --- |
| Start > Cal | Стандарт калибровки |
| Zero | Вода очищенная |
| 1-3 | Стандарт калибровки |
| 4-6 | КО высокий |
| 7-15 | Образец 1-3 |
| 16 | Пусто |
| Cal | Стандарт калибровки |
| 17-19 | Стандарт калибровки |
| 20-22 | КО высокий |
| 23-28 | Образец 4-5 |
| 29-31 | Стандарт калибровки |

|  |  |
| --- | --- |
| Start > Cal | Стандарт калибровки |
| Zero | Вода очищенная |
| 1-3 | Стандарт калибровки |
| 4-6 | КО высокий |
| 7-12 | Образец 1-2 |
| 13-15 | Стандарт калибровки |

Результаты анализа содержания натрия (Х) в мг/мл в восстановленном препарате вычисляют по формуле:

Х = (b D M) / 1000

где: b - результат определения концентрации натрия на дисплее прибора;

D - коэффициент разведения;

M - молекулярная масса натрия (23,0 г/моль).

Критерии приемлемости результатов

- подтверждение калибровки: после каждой калибровки прибора среднее значение результатов определения концентрации натрия для 3 определений растворов стандартов калибровки должно находиться в пределах 139,0-141,0 ммоль/л.

- среднее значение результатов определения концентрации натрия для всех контрольных образцов должно быть в пределах норм, указанных в соответствующем сертификате анализа.

- для каждого раствора стандартного образца и контрольного образца стандартное отклонение для 3 результатов не должно превышать 2 %. В случае случайных отклонений пламени, вызывающих разброс значений, 1 из 3 результатов может быть исключен.

- для испытуемых образцов стандартное отклонение для 6 результатов не должно превышать 2 %. В случае случайных отклонений пламени, вызывающих разброс значений, 2 из 6 результатов (по одному для каждого разведения) могут быть исключены.

- подтверждение стабильности работы прибора: среднее значение результатов для 3 определений растворов стандартных образцов калибровки должно находиться в пределах 138,0-142,0 ммоль/л.

**Кальций**

От 63 до 85 мкг/мл в восстановленном растворе. Определение проводят спектрофотометрическим методом в соответствии с ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях».

Реактив (50 ммоль/л фосфатный буфер, pH 7,5; 5 ммоль/л 8-гидроксихинолин-5-сульфоновая кислота; 120 мкмоль/л арсеназо III; детергенты);

*Испытуемый образец.* Образец препарата растворяют в 2,5 мл воды для инъекций и хранят не более 3 ч при температуре от 15 до 25 °С.

Стандартный образец 2,5 ммоль/л кальция. Готовый набор. Хранят при температуре от 2 до 8 °С в соответствии с указанием на упаковке.

*Раствор внешнего стандарта.* Раствор стандарта из набора готов к использованию.

*Контрольный образец (КО).*Контрольный образец размораживают при температуре не более 37 °С, выдерживают до температуры 15-25 °С и хранят не более 3 ч.

*\** Перед использованием все растворы и материалы должны храниться при температуре 15-25 °С.

В каждой серии испытаний для калибровки по одной концентрации дважды проводят измерения стандарта образца 2,5 ммоль/л кальция.

В пластиковые пробирки вносят по 10 мкл стандарта, контрольного образца или испытуемого раствора, добавляют 1000 мкл реактива из набора, тщательно перемешивают и измеряют оптическую плотность при 650 нм против раствора сравнения (1000 мкл реактива). Измерение проводят в промежуток времени 5-45 мин после смешивания в двух параллельных.

Концентрацию кальция (С) в мкг/мл вычисляют с помощью программного обеспечения по формуле:

где: Со - концентрация кальция в стандартном образце, 2,5 ммоль/л;

А1 - оптическая плотность испытуемого раствора;

Ао - оптическая плотность стандартного образца;

40,8 - молекулярная масса кальция, мкг/мкмоль.

Критерии приемлемости результатов

- результат определения концентрации кальция в контрольном образце должен быть в пределах норм, указанных в соответствующем сертификате анализа.

- концентрация кальция в испытуемом образце должна быть в пределах допустимых значений 0,3 - 4,0 ммоль/л.

**Хлориды.** От 9,6 до 14,4 мг/мл в восстановленном растворе. Определение проводят методом потенциометрического титрования.

Испытуемый образец. Препарат восстанавливают в 2,5 мл воды для инъекций и хранят не более 3 ч при температуре от 15 до 25 °С.

*Контрольный образец (КО).* Натрия хлорида раствор 0,1 М.

*Стандартизация 0,01 М**раствора серебра нитрата (титранта).* Титрант следует стандартизировать в начале каждой серии испытаний, определяя содержание хлорида в 0,1 М растворе натрия хлорида. К 500 мкл 0,1 М раствора натрия хлорида добавляют 5 мл азотной кислоты раствора 2 %, около 50 мл воды очищенной и титруют серебра нитрата раствором 0,01 М. Стандартизацию проводят трижды и вычисляют среднее значение содержания хлорида в натрия хлориде растворе 0,1 М.

Перед началом каждого анализа проводят титрование контрольного раствора: 50 мл воды очищенной помещают в стакан вместимостью 150 мл, добавляют 5 мл азотной кислоты раствора 2 % и титруют 0,01 М раствором нитрата серебра.

Для проведения титрования 200 мкл испытуемого образца вносят в стакан вместимостью 150 мл, добавляют 5 мл азотной кислоты раствора 2 %, 50 мл воды очищенной и титруют 0,01 М раствором нитрата серебра.

Титрование каждого испытуемого образца проводят трижды.

Содержание хлорида (Х) в мг/мл вычисляют по формуле:

Х =

V1 - Объем 0,01 М раствора нитрата серебра, израсходованный на титрование испытуемого образца, мл;

Vk - Объем 0,01 М раствор нитрата серебра, израсходованный на титрование контрольного раствора, мл;

0,01 - молярность серебра нитрата раствора;

35,453 - молекулярная масса хлорида, г/моль;

V - объем образца для титрования, мл.

Критерии приемлемости результатов анализа

- среднее значение содержания хлорида в 0,1 М растворе натрия хлорида не должно отличаться от ожидаемого значения (0,1 М = 0,003 мг/мл) более чем на ± 5%;

- относительное стандартное отклонение (RSD) результатов определения содержания хлорида в испытуемых образцах раствора нитрата серебра должно быть не более 2 % (3 определения).

**Аргинин.** От 3,6 до 5,4 мг/мл в восстановленном растворе.Определение проводят методом обращено-фазной ВЭЖХ в соответствии с ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография».

*Подвижная фаза А (ПФА) (140 мМ ацетат натрия, 17 мМ триэтиламин).* В мерной посуде вместимостью 1000 мл растворяют в 900 мл воды для инъекций 19,1 г натрия ацетата тригидрата и 2,4 мл триэтиламина, устанавливают pH до 5,05 фосфорной кислоты раствором (85-87 %), доводят объем раствора до 1000 мл и фильтруют через фильтр с размером пор 0,2 мкм. Раствор хранят в течение 1 мес при температуре от 2 до 8 °С.

*Подвижная фаза В (ПФВ) (60 % ацетонитрил).* Смешивают 600 мл ацетонитрила и 400 мл воды очищенной и хранят в течение 1 мес при температуре от 2 до 8 °С.

*Испытуемый образец*. Содержимое флаконов восстанавливают в 2,5 мл воде для инъекций и хранят не более 3 ч при температуре от 15 до 25 °С.

Перед использованием к 250 мкл образца и 300 мкл раствора внутреннего стандарта прибавляют 2450 мкл 20 мМ хлористоводородной кислоты до конечной концентрации L-аргинина гидрохлорида около 0,3 мг/мл (разведение 1:12).

*Раствор внутреннего стандарта.* В мерную колбу вместимостью 200 мл вносят точную навеску 0,2 ± 0,01 г 2-DL-аминомасляной кислоты, растворяют в 20 мМ растворе хлористоводородной кислоты, доводят объем раствора до метки этим же растворителем и перемешивают. Раствор хранят в течение 2 мес при температуре от 4 до 8 °С (аликвоты объемом 2 мл в криовиалах - не более 2 лет при температуре минус 70 °С).

*Исходный раствор L-аргинина гидрохлорида.* В мерную колбу вместимостью 100 мл вносят (0,35 ± 0,005) г точную навеску L-аргинина гидрохлорида, растворяют в 20 мМ растворе хлористоводородной кислоты, доводят объем раствора до метки этим же растворителем и перемешивают. Раствор хранят в течение 2 мес при температуре от 4 до 8 °С (аликвоты объемом 2 мл в криовиалах - не более 2 лет при температуре минус 70 °С).

*Раствор стандартного образца (СО).* Смешивают 500 мкл исходного раствора L-аргинина гидрохлорида, 500 мкл раствора внутреннего стандарта и 4000 мкл 20 мМ хлористоводородной кислоты. Концентрация L-аргинина гидрохлорида - около 0,35 мг/мл, 2-DL -аминомасляной кислоты - около 0,10 мг/мл. Раствор используют свежеприготовленный.

*Контрольный образец (КО).* Контрольный образец размораживают при температуре не более 37 °С, доводят до температуры 15-25 °С и хранят не более 3 ч при температуре от 15 до 25 °С. Перед использованием к 250 мкл контрольного образца и 300 мкл раствора внутреннего стандарта добавляют 2450 мкл 20 мМ хлористоводородной кислоты до конечной кон­центрации L-аргинина гидрохлорида около 0,3 мг/мл (разведение 1:12). Контрольный образец анализируют при каждом определении L-аргинина гидрохлорида в испытуемом препарате.

В пробирку вносят 70 мкл реактива 1 (боратный буфер) (готовый реактив). В соответствующие флаконы добавляют по 10 мкл испытуемого образца, контрольного образца, раствора стандартного образца и перемешивают. При перемешивании на вихревом смесителе добавляют 20 мкл реактива 2 (порошок) (готовый реактив) и продолжают встряхивать еще несколько сек. Смесь выдерживают примерно 1 мин, затем 300 мкл вносят во флакон автодозатора. Анализ можно проводить в микрофлаконах для ВЭЖХ с широким основанием (для проведения эффективной гомогенизации всего объема) вместимостью 300 мкл. Перед вводом пробы должны отстояться в течение 60 мин в автодозаторе, или их следует прогреть в течение 10 мин при температуре 55 °С.

Хроматографические условия

Колонка: 150 × 3,9 мм, силикагель октадецилсилильный для хроматографии, 4 мкм

Предколонка: 20 × 3,9 мм, силикагель октадецилсилильный для хроматографии, 4 мкм

Скорость потока: 1,0 ± 0,1 мл/мин

Вводимый объем: 10 мкл

Детекция: УФ 248 нм

Время хроматографии: 43 мин

Температура колонки: 37±2°С

Температура образца: от 4 до 8 °С

Программа градиента

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Время (мин) | Подвижная фаза А,%  элюента А | Подвижная фаза В,% |
| 0 | 100 | 0 |
| 0,5 | 98 | 2 |
| 10,0 | 93 | 7 |
| 14,0 | 87 | 13 |
| 28,0 | 68 | 32 |
| 28,1 | 0 | 100 |
| 33,0 | 0 | 100 |
| 33,1 | 100 | 0 |
| 43,0 | 100 | 0 |

Последовательность вводов образцов приведена в таблице.

В таблице указывают содержимое каждого флакона в автодозаторе, «калибровка» для раствора стандартного образца и разведение для контрольного образца и испытуемых образцов.

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Флакон | Образец | Число вводов | Тип | Уровень калибр. | Разведение |
| 1 | ПФА  фазаА | 2 | образец |  |  |

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 2 | СО | 1 | калибровка | 1 |  |
| 2 | со | 1 | калибровка | 1 |  |
| 2 | со | 1 | калибровка | 1 |  |
| 3 | со | 1 | калибровка | 1 |  |
| 4 | со | 1 | калибровка | 1 |  |
| 4 | со | 1 | калибровка | 1 |  |
| 5 | ко | 1 | образец |  | 1:12 |
| 6- 10 | Образец | 1 | образец |  | 1:12 |
| 5 | КО | 1 | образец |  | 1:12 |
| 1 | ПФА | 1 | образец |  |  |

Пробирки системы ВЭЖХ промывают подвижными фазами А и В, систему с установленной колонкой промывают подвижной фазой В со скоростью 1 мл/мин. Вводят подвижную фазу А для проверки отсутствия на хроматограмме пиков, мешающихся определению.

Содержание аргинина в испытуемом образце (СArg) в мг/мл вычисляют методом внутреннего стандарта по формуле:

СArg (мг/мл) =

где: S1 - площадь пика аргинина на хроматограмме испытуемого

образца;

So - площадь пика внутреннего стандарта;

Co - концентрация внутреннего стандарта, мг/мл;

D - коэффициент разведения;

0,827 - коэффициент пересчета концентрации аргинина

гидрохлорида в концентрацию аргинина (ММ аргинина - 174,2 г/моль, ММ аргинина гидрохлорида - 210,66 г/моль);

K - калибровочный коэффициент, вычисленный методом программного обеспечения после ввода стандартного раствора по формуле:

где: S1 - среднее значение площади пика аргинина;

So - среднее значение площади пика внутреннего стандарта;

Co - концентрация внутреннего стандарта, мг/мл;

C1 - концентрация L-аргинина гидрохлорида, мг/мл.

Время удерживания пика аргинина должно быть около 16 мин.

Время удерживания пика внутреннего стандарта должно быть около 21 мин.

Пригодность хроматографической системы

На хроматограмме раствора стандартного образца аргинина:

- концентрация аргинина в растворе стандартного образца должна быть 0,29 мг/мл;

- относительное стандартное отклонение (RSD) площади пика внутреннего стандарта должно быть не более 5 % (6 определений);

-коэффициент асимметрии (As) пика внутреннего стандарта должен быть в диапазоне от 0,8 до 1,5;

- эффективность хроматографической колонки (N), рассчитанная по пику аргинина должна составлять более 2000 числа теоретических тарелок;

- результат определения концентрации аргинина в контрольном образце должен быть в пределах норм, указанных в соответствующем сертификате анализа.

**Хранение.** В защищенном от света месте при температуре от 2 до 8 ° С в соответствии с ОФС «Хранение лекарственных средств».