МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |
| --- |
|  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Апротинин** |  | **ФС.2.3.0006** |
| **Апротинин** |  |  |
| **Aprotininum** |  | **Взамен ВФС 42-2175-92** |

|  |
| --- |
|  |

|  |  |
| --- | --- |
|  | |
| C284H432N84O79S7 | М.м. 6511,4 |
| [9087-70-1] |  |

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

*S*5,*S*55:*S*14,*S*38:*S*30,*S*51-Трицикло(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-аргинил-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).

Содержит не менее 90,0 % и не более 110,0 % заявленной активности апротинина C284H432N84O79S7 на сухое вещество.

СВОЙСТВА

**Описание.** Белый или почти белый порошок.

\*Гигроскопичен.

**Растворимость**. Растворим в воде и натрия хлорида растворе 0,9 %, практически нерастворим в хлороформе.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ

*1. ТСХ* (ОФС «Тонкослойная хроматография»).

# *Пластинка.* ТСХ пластинка со слоем силикагеля 60 F254.

# *Подвижная фаза (ПФ*). Вода—уксусная кислота ледяная, содержащая 100 г/л натрия ацетата безводного 40:50.

*Испытуемый раствор*. Готовят раствор, содержащий 27 000 КИЕ/мл апротинина.

*Раствор стандартного образца апротинина.* Фармакопейный стандартный образец апротинина разводят водой до получения раствора с активностью 27 000 КИЕ/мл.

*Реактив для детектирования.* Растворяют 0,1 г нингидрина в смеси 6 мл раствора меди(II) хлорида с концентрацией 10 г/л, 21 мл уксусной кислоты ледяной и 70 мл этанола.

На линию старта пластинки наносят по 10 мкл испытуемого раствора и раствора фармакопейного стандартного образца апротинина. Пластинку с нанесёнными пробами сушат при температуре 60 °С, помещают в камеру с ПФ и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт ПФ пройдёт около 80–90 % длины пластинки от линии старта, её вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей, опрыскивают реактивом для детектирования и просматривают в видимом свете.

*Результат.* Основная зона адсорбции на хроматограмме испытуемого раствора по положению, величине и окраске должна соответствовать зоне адсорбции апротинина на хроматограмме раствора стандартного образца апротинина.

*2.*Субстанция должна обладать антитрипсиновой активностью.

*Испытуемый раствор*. Готовят раствор, содержащий 27 000 КИЕ/мл апротинина. В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 1,0 мл полученного раствора и доводят объём раствора буферным раствором рН 7,2 до метки.

*Раствор хлористоводородной кислоты 0,002 М*. Разбавляют 2,0 мл хлористоводородной кислоты раствора 0,1 М водой до 100,0 мл.

*Раствор стандартного образца трипсина*. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 10 мг фармакопейного стандартного образца трипсина, растворяют в растворе хлористоводородной кислоты 0,002 М и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

*Растворитель*. Уксусная кислота ледяная—вода—этанол 1:49:50.

*Раствор казеина.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 0,2 г казеина, растворяют в буферном растворе рН 7,2 и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

Смешивают 1,0 мл испытуемого раствора с 1,0 мл раствора стандартного образца трипсина, оставляют на 10 мин и прибавляют 1,0 мл раствора казеина. Полученный раствор термостатируют при температуре 35 °С в течение 30 мин, затем охлаждают в ледяной воде и прибавляют 0,5 мл растворителя, встряхивают и оставляют при комнатной температуре на 15 мин. Раствор должен мутнеть.

Контрольный раствор готовят в тех же условиях, используя буферный раствор рН 7,2 вместо испытуемого раствора. Контрольный раствор не должен мутнеть.

ИСПЫТАНИЯ

Прозрачность раствора. Раствор субстанции, содержащий 27 000 КИЕ/мл, должен быть прозрачным (ОФС «Прозрачность и степень опалесценции (мутности) жидкостей»).

Цветность раствора. Раствор, полученный в испытании «Прозрачность раствора», должен выдерживать сравнение с эталоном Y7 (ОФС «Степень окраски жидкостей», метод 2).

**рН раствора.** От 5,0 до 7,0 (раствор субстанции, содержащий 10 000 КИЕ/мл, ОФС «Ионометрия», метод 3).

**Оптическая плотность**. Оптическая плотность раствора субстанции, содержащего 5400 КИЕ/мл, измеренная при длине волны 277 нм в кювете с толщиной слоя 1 см, должна быть не более 0,80 (ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях»).

**Родственные примеси**

***1. Дез-Ала-апротинин и дез-Ала-дез-Гли-апротинин.*** Определение проводят методом капиллярного зонного электрофореза с процедурой нормализации (ОФС «Капиллярный электрофорез»).

*Ведущий электролит.* Растворяют 8,21 г калия дигидрофосфата в 400 мл воды и доводят рН раствора фосфорной кислотой до 3,0. Количественно переносят полученный раствор в мерную колбу вместимостью 500 мл и доводят объём раствора водой до метки.

*Испытуемый раствор.* Готовят раствор субстанции в воде, содержащий не менее 1800 КИЕ/мл.

*Раствор стандартного образца апротинина.* Готовят раствор фармакопейного стандартного образца апротинина в воде с концентрацией, равной концентрации апротинина в испытуемом растворе.

Примечание

Примесь А: апротинин-(1-56)-пептид.

Примесь В:апротинин-(1-57)-пептид*.*

*Электрофоретические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Капилляр | плавленый кварц без покрытия, эффективная длина 45–60 см, внутренний диаметр 75 мкм; |
| Температура капилляра | 25 оС; |
| Прекондиционирование капилляра | 1 мин натрия гидроксида раствор 0,1 М при 5 кПа,  2 мин разделяющий буферный раствор при 5 кПа; |
| Детектор | спектрофотометрический, 214 нм; |
| Ввод пробы | 3 с 3,5 кПа; |
| Напряжение | 0,2 кВ/см; |
| Время анализа | 30 мин. |

*Относительное время миграции соединений.* Апротинин – 1 (около 22 мин); примесь А – около 0,98; примесь В – около 0,99.

*Идентификация примесей.* Для идентификации пиков примесей А и В используются электрофореграмма раствора стандартного образца апротинина и электрофореграмма, прилагаемая к фармакопейному стандартному образцу апротинина.

*Пригодность электрофоретической системы*

На электрофореграмме раствора стандартного образца апротинина:

- абсолютное время миграции апротинина должно составлять от 19 до 25 мин;

- *разрешение (RS)* между пиками примесей А и В должно быть не менее 0,8;

- *разрешение (RS)* между пиками примеси В и апротинина должно быть не менее 0,5;

- распределение пиков: электрофореграмма испытуемого раствора должна быть качественно и количественно аналогична электрофореграмме раствора стандартного образца апротинина;

- *отношение сигнал/шум (S/N)* для пика апротинина должно быть не менее 1000. При необходимости изменяют концентрацию испытуемого раствора для получения пиков достаточной высоты.

На электрофореграмме испытуемого раствора основная зона по положению должна совпадать с положением зоны апротинина на электрофореграмме раствора стандартного образца апротинина.

*Допустимое содержание примесей:*

- примесь А – не более 8,0 %;

- примесь В – не более 7,5 %.

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

*Подвижная фаза А (ПФА).* В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 3,52 г калия дигидрофосфата и 7,26 г динатрия гидрофосфата гептагидрата, растворяют в 500 мл воды и доводят объём раствора водой до метки.

*Подвижная фаза Б (ПФБ).* В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 3,52 г калия дигидрофосфата, 7,26 г динатрия гидрофосфата гептагидрата и 66,07 г аммония сульфата, растворяют в 500 мл воды и доводят объём раствора водой до метки.

*Испытуемый раствор.* Готовят раствор субстанции в ПФА, содержащий около 9000 КИЕ/мл.

*Раствор для проверки пригодности хроматографической системы.* Содержимое флакона фармакопейного стандартного образца апротинина для проверки пригодности хроматографической 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 10 мл помещают 0,5 мл полученного раствора и доводят объём раствора ПФА до метки.

Примечание

Примесь С ((5-оксопролил)апротинин): *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-аргинил-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).

*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; |
| Объём пробы | 40 мкл. |

*Режим хроматографирования*

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

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

*Относительное время удерживания соединений.* Апротинин – 1 (17–20 мин); примесь С – около 0,9.

*Пригодность хроматографической системы*

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

На хроматограмме раствора для проверки пригодности хроматографической системы:

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

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

*Допустимое содержание примесей.* Содержание каждой из примесей в субстанции в процентах вычисляют согласно методу нормирования (ОФС «Хроматография»):

- примесь С ‒ не более 1,0 %;

- любая другая примесь – не более 0,5 %;

- сумма примесей – не более 1,0 %.

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

***3. Олигомеры апротинина.*** Определение проводят методом эксклюзионной хроматографии (ОФС «Эксклюзионная хроматография»).

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

*Испытуемый раствор.* Готовят раствор субстанции в воде, содержащий около 9000 КИЕ/мл.

*Раствор для проверки пригодности хроматографической системы.* В стеклянный флакон с завинчивающейся крышкой помещают 30 мг субстанции, выдерживают в сушильном шкафу при температуре 110±5 °С в течение 4 ч, охлаждают. В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 18 мг субстанции, 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 раствора водой до метки. В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 1,0 мл полученного раствора и доводят объём раствора водой до метки.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | три последовательно соединённые колонки для эксклюзионной хроматографии 300 × 7,8 мм, с диапазоном разделяемых масс, подходящим для разделения апротинина, его димера и олигомеров (например, от 2000 до 80000), 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.

*Относительное время удерживания соединений.* Мономер апротинина – 1 (около 25 мин); димер апротинина – около 0,9.

*Идентификация примесей.* Для идентификации пика димера апротинина используют хроматограмму раствора для проверки пригодности хроматографической системы.

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

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

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

*Допустимое содержание примесей.* Содержание каждой из примесей в субстанции в процентах вычисляют согласно методу нормирования (ОФС «Хроматография»):

- сумма примесей – не более 1,0 %.

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

**Потеря в массе при высушивании.** Не более 6,0 % (ОФС «Потеря в массе при высушивании», способ 2). Для определения 0,1 г (точная навеска) субстанции сушат до постоянной массы не менее 24 ч.

**Сульфатная зола.** Не более 3,0 % (ОФС «Сульфатная зола»). Для определения используют 0,2 г (точная навеска) субстанции.

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

Бактериальные эндотоксины. Не более 0,877 ЕЭ на 1000 КИЕ апротинина (ОФС «Бактериальные эндотоксины»).

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

**Микробиологическая чистота**. В соответствии сОФС «Микробиологическая чистота».

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Определение проводят методом титриметрии (ОФС «Титриметрия (титриметрические методы анализа)»).

Активность апротинина определяют путём измерения ингибирующего действия на раствор трипсина с известной активностью. Ингибирующую активность апротинина рассчитывают как разность между начальным и остаточным значениями активности трипсина.

1800 единиц ингибитора протеаз (ЕИП) ингибирует 50 % ферментной активности 2 микрокаталей трипсина.

Все растворы используют свежеприготовленными.

*Испытуемый раствор*. Готовят раствор субстанции в 0,0015 М боратном буферном растворе (рН 8,0), содержащий около 3000 КИЕ/мл.

*Раствор стандартного образца трипсина.* Готовят раствор фармакопейного стандартного образца трипсина с концентрацией 0,8 микрокаталей/мл в 0,001 М растворе хлористоводородной кислоты. Раствор готовят непосредственно перед использованием и хранят на ледяной бане.

*Раствор стандартного образца трипсина разбавленный.* Разбавляют 0,5 мл раствора стандартного образца трипсина до 10,0 мл 0,0015 М боратным буферным раствором рН 8,0. Полученный раствор выдерживают при температуре 20–25 °С в течение 10 мин, затем помещают на ледяную баню.

*Раствор бензоиларгинина этилового эфира гидрохролида 0,69 %.* В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 0,345 г (точная навеска) бензоиларгинина этилового эфира гидрохролида, растворяют в воде и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

*Раствор трипсина и апротинина.* К 4,0 мл раствора стандартного образца трипсина прибавляют 1,0 мл испытуемого раствора, немедленно разбавляют до 40,0 мл 0,0015 М боратным буферным раствором рН 8,0. Полученный раствор выдерживают при температуре (20+5) °С в течение 10 мин, затем помещают на ледяную баню. Раствор используют в течение 6 ч после приготовления.

В ходе проведения испытания в реакторе обеспечивают постоянную атмосферу азота, непрерывное перемешивание и постоянную температуру (25+0,1) °С.

В реактор помещают 9,0 мл 0,0015 М боратного буферного раствора рН 8,0 с температурой 25±0,1 °С, прибавляют 1,0 мл раствора бензоиларгинина этилового эфира гидрохролида 0,69 %, доводят рН раствора 0,1 М раствором натрия гидроксида до 8,0. После того как температура достигнет равновесия при 25±0,1 °С, прибавляют 1,0 мл раствора трипсина и апротинина. Прибавляют 0,1 М раствор натрия гидроксида, поддерживая рН 8,0 и регистрируя расход титранта каждые 30 с. Испытания проводят в течение 6 мин. Определяют ежесекундный расход 0,1 М раствора натрия гидроксида в мл (n1, мл).

В тех же условиях титруют 1,0 мл раствора стандартного образца трипсина разбавленного, определяя ежесекундный расход 0,1 М раствора натрия гидроксида в мл (n2, мл).

Активность субстанции в калликреиновых единицах (КИЕ) на мг (*Х*) вычисляют по формуле:

*,*

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *n*1 | **–** | ежесекундный расход 0,1 М раствора натрия гидроксида, израсходованного на титрование раствора трипсина и апротинина, мл; |
|  | *n*2 | **–** | ежесекундный расход 0,1 М раствор натрия гидроксида, израсходованного на титрование раствора стандартного образца трипсина разбавленного, мл. |

ХРАНЕНИЕ

В герметично укупоренной упаковке, в защищённом от света месте.

\*Приводится для информации.