МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |
| --- |
|  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Протамина сульфат** |  | **ФС.2.3.0005** |
| **Протамина сульфат** |  |  |
| **Protamini sulfas** |  | **Взамен ФС 42-1256-79** |

|  |
| --- |
|  |

|  |
| --- |
| [9009-65-8] |

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Сульфаты основных пептидов, извлечённых из сперматозоидов или молоки рыб, обычно видов *Salmonidae*. Связывается с гепарином в растворе, ингибируя его антикоагулянтную активность; в условиях анализа это связывание приводит к образованию осадка.В расчёте на высушенное вещество 1 мг протамина сульфата осаждает не менее 100 МЕ гепарина.

Содержитне менее 90,0 % и не более 110,0 % протамина сульфата в пересчёте на сухое и свободное от серной кислоты вещество.

СВОЙСТВА

**Описание.** Белый или почти белый порошок со слабым характерным запахом.

\*Гигроскопичен.

**Растворимость**. Умеренно растворим в воде, практически нерастворим в спирте 96 %.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ

*1. Антигепариновая активность*. Должна соответствовать требованиям раздела «Количественное определение».

*2. ВЭЖХ.* Время удерживания четырёх основных пиков (протаминовых пептидов *A, B, C, D*) на хроматограмме испытуемого раствора должно соответствовать времени удерживания пиков (протаминовых пептидов *A, B, C, D*), на хроматограмме раствора стандартного образца протамина сульфата (раздел «Родственные примеси»).

Относительное содержание пептидов *A, B, C, D* в субстанции рассчитывают методом внутренней нормализации. Содержание пептида *А* в испытуемом растворе должно составлять от 13 до 18 %; пептида *В* – от 21 до 28 %; пептида *С* – от 31 до 38 %; пептида *D* – от 19 до 24 %.

*3. Качественная реакция.* К 0,5 мл раствора А, полученного в испытании «Прозрачность раствора», прибавляют 4,5 мл воды, 1,0 мл натрия гидроксида раствора 10 %, 1,0 мл α-нафтола раствора 0,1 % и перемешивают. Смесь охлаждают до 5 °С и прибавляют 0,5 мл натрия гипобромита раствора; должно образоваться красное окрашивание.

*4. Качественная реакция.* Субстанция должна давать реакцию на сульфаты (ОФС «Общие реакции на подлинность»).

ИСПЫТАНИЯ

**Удельное вращение.** От –65 до –85 в пересчёте на сухое вещество (1 % раствор субстанции в хлористоводородной кислоты растворе 0,1 М, ОФС «Оптическое вращение»).

**Прозрачность раствора.** Растворяют 0,2 г субстанции в 10 мл воды (раствор А). К 2,5 мл полученного раствора прибавляют 7,5 мл воды. Полученный раствор должен выдерживать сравнение с эталоном II (ОФС «Прозрачность и степень опалесценции (мутности) жидкостей»).

**Цветность раствора.** Раствор, полученный в испытании «Прозрачность раствора», должен выдерживать сравнение с эталоном BY6 или Y6 (ОФС «Степень окраски жидкостей», метод 2).

**Оптическая плотность.** Оптическая плотность 1,0 % раствора субстанции в воде, измеренная при длине волн от 260 до 280 нм в кювете с толщиной слоя 1 см, не должна превышать 0,1 (ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях»).

**рН.** От 6,0 до 7,5 (1,0 % раствор субстанции, ОФС «Ионометрия», метод 3).

Родственные примеси. Определение проводят методом ВЭЖХ (ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография»).

Растворы используют свежеприготовленными.

*Подвижная фаза А (ПФА)*. Трифторуксусная кислота—ацетонитрил—вода 1:50:950.

*Подвижная фаза  Б (ПФБ).* Трифторуксусная кислота—ацетонитрил—вода 1:500:500.

Испытуемый раствор. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 30 мг субстанции, растворяют в 400 мкл хлористоводородной кислоты 6 М и доводят объём раствора хлористоводородной кислотой 0,01 М до метки.

Раствор стандартного образца протамина сульфата. В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 3 мг (точная навеска) фармакопейного стандартного образца протамина сульфата, содержащего пептиды А, В, С, D, растворяют в 40 мкл хлористоводородной кислоты раствора 6 М и доводят объём раствора хлористоводородной кислоты раствором 0,01 М до метки.

Раствор для проверки пригодности хроматографической системы. В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 1 мл раствора стандартного образца протамина сульфата и доводят объём раствора хлористоводородной кислоты раствором 0,01 М до метки.

*Условия хроматографирования*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 150 × 4,6 мм, силикагель октадецилсилильный, с пористой поверхностью на непористой основе, эндкепированный, для хроматографии, 3,6 мкм; |
| Температура колонки | 45 °С; |
| Скорость потока | 1,5 мл/мин; |
| Детектор | спектрофотометрический, 210 нм; |
| Температура автосамплера | 5 °С; |
| Объём пробы | 30 мкл; |
| Время хроматографирования | 25 мин. |

*Режим хроматографирования*

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Время, мин | ПФА, % | ПФБ, % |
| 0–2 | 95  | 5 |
| 2–17 | 95 → 80 | 5 → 20 |
| 17–17,2 | 80 → 20 | 20 → 80 |
| 17,2–20 | 20 | 80 |

Хроматографируют раствор для проверки пригодности хроматографической системы*,* раствор стандартного образца протамина сульфата и испытуемый раствор.

*Относительное время удерживания соединений.* Пептид А – 1 (от 9 до 13 мин); пептид В – около 1,05; пептид C – около 1,10; пептид D – около 1,15.

*Пригодность хроматографической системы.* На хроматограмме раствора стандартного образца протамина сульфата:

- должно наблюдаться 4 основных пика (пептиды от А до D), время удерживания которых должны находиться в пределах от 8 до 17 мин;

- *разрешение (R)* между пиками пептида А и пептида B должно быть не менее 2,0; между пиками пептида B и пептида C должно быть не менее 2,0; между пиками пептида C и пептида D должно быть не менее 2,0;

*- фактор асимметрии (As)* пика пептида А должен быть не более 1,8; пика пептида B – не более 1,5; пика пептида С– не более 2,5; пика пептида D – не более 2,2;

- *относительное стандартное отклонение* суммы площадей пиков пептидов A, B, C и D – не более 2% (6 введений);

- *отношение сигнал/шум* *(S/N)* для пика пептида А на хроматограмме раствора для проверки пригодности хроматографической системы – не менее 10.

*Допустимое содержание примесей.* Суммарное содержание примесей в субстанции в процентах ($X$) вычисляют по формуле:

$$X=100-\left(\frac{S\_{А}+S\_{B}+S\_{C}+S\_{D}}{\sum\_{}^{}S}∙100\right),$$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | $$S\_{А}+S\_{B}+S\_{C}+S\_{D}$$ | − | сумма площадей пиков пептидов A, B, C и D на хроматограмме испытуемого раствора; |
|  | *ΣS* | − | сумма площадей всех пиков на хроматограмме испытуемого раствора. |

Допустимое суммарное содержание примесей – не более 8,0 %.

При суммарном содержании примесей менее 0,5 % результат испытания указывают как «менее 0,5 %».

**Потеря в массе при высушивании.** Не более 5,0 % (ОФС «Потеря в массе при высушивании»). Для определения используют 1 г (точная навеска) субстанции.

**Азот.** От 21,0 до 26,0 %, в пересчёте на сухое вещество (ОФС «Определение азота в органических соединениях методом Кьельдаля, метод 1). Для определения используют 70 мг субстанции и проводят минерализацию в течение 3–4 часов. В качестве титранта используют 0,1 М раствор хлористоводородной кислоты.

**Железо**. Не более 0,001 % (ОФС «Железо», метод 2). Растворяют 1,0 г субстанции при нагревании в 10 мл воды.

**Сульфаты.** Не менее 16 % и не более 24 %, в пересчёте на сухое вещество. В химический стакан помещают 0,15 г (точная навеска) субстанции, растворяют в 15 мл воды, прибавляют 5 мл хлористоводородной кислоты разведённой 7,3 %, нагревают до кипения и медленно прибавляют к кипящему раствору 10 мл бария хлорида раствора 10 %. Накрывают стакан, нагревают в течение 1 ч на водяной бане и фильтруют. Осадок промывают несколько раз горячей водой, до отрицательной реакции на хлориды, высушивают и прокаливают в предварительно взвешенном тигле при температуре от 550 до 650 °С до постоянной массы.

1,0 г остатка соответствует 0,4117 г сульфатов SO4.

**Сульфатная зола.** Не более 0,5 % (ОФС «Сульфатная зола»). Для определения используют 1 г (точная навеска) субстанции.

**Ртуть.** Не более 0,001 %.

*Растворитель.* Азотная кислота концентрированная*—*серная кислота концентрированная 1:1.

*Испытуемый раствор.* В коническую колбу вместимостью 250 мл помещают 2,0 г субстанции, прибавляют 20,0 мл растворителя, кипятят с обратным холодильником в течение 1 ч, охлаждают и осторожно разбавляют водой. Кипятят до полного исчезновения паров азотной кислоты. Смесь охлаждают и количественно переносят в мерную колбу вместимостью 200 мл, доводят объём раствора водой до метки и фильтруют. Переносят 50,0 мл фильтрата в делительную воронку, встряхивают последовательно с небольшими порциями хлороформа до обесцвечивания хлороформного слоя. Отделяют хлороформный слой. К водному слою прибавляют 25,0 мл серной кислоты разведённой 9,8 %, 115,0 мл воды и 10,0 мл гидроксиламина гидрохлорида раствора 20 %. Титруют дитизона раствором 0,0012 %, после каждого прибавления титранта смесь тщательно перемешивают, к концу титрования смесь оставляют для разделения слоёв. Отделяют хлороформный слой и продолжают титровать до появления синевато-зелёного окрашивания.

Параллельно проводят контрольный опыт.

Рассчитывают содержание ртути, используя эквивалент в мкг ртути на 1 мл титранта, определённый при установке титра дитизона раствора 0,0012 %.

**Тяжёлые металлы.** Не более 0,002 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Тяжёлые металлы» (метод 3Б), в остатке, полученном в испытании «Сульфатная зола», с использованием эталонного раствора 2.

**Остаточные органические растворители.** В соответствии с ОФС «Остаточные органические растворители».

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

**Бактериальные эндотоксины.** Не более 2,33 ЕЭ на 1 мг субстанции (ОФС «Бактериальные эндотоксины»).

**Микробиологическая чистота.** В соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота».

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ

**Антигепариновая активность***.* Определение проводят методом титриметрии.

Все испытуемые растворы и раствор стандартного образца протамина сульфата готовятся в двух повторностях; для каждого раствора проводится 3 определения.

*Испытуемый раствор А.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 15 мг (точная навеска) субстанции, растворяют в воде и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

*Испытуемый раствор Б.* К 10,0 мл испытуемого раствора А прибавляют 5,0 мл воды и перемешивают.

*Испытуемый раствор В.* К 10,0 мл испытуемого раствора А прибавляют 20,0 мл воды и перемешивают.

*Раствор стандартного образца гепарина натрия (титрант).* Готовят раствор фармакопейного стандартного образца гепарина натрия в воде с концентрацией гепарина натрия около 170 МЕ/мл.

В кювету помещают 1,5 мл титруемого раствора (испытуемый раствор А; испытуемый раствор Б; испытуемый раствор В), устанавливают подходящую длину волны в видимой области спектра, прибавляют титрант в малых количествах до резкого увеличения абсорбции и записывают объём.

*Антигепариновая активность.* Количество связанного гепарина натрия в МЕ на 1 мг субстанции (*A*) вычисляют по формуле:

$$A=\frac{V\_{i}∙C\_{Т }}{1,5·C\_{i}},$$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | $$V\_{i}$$ | **–** | объём титранта, израсходованный на титрование каждого испытуемого раствора, мл; |
|  | $$C\_{Т }$$ | **–** | концентрация гепарина натрия, МЕ/мл; |
|  | $$C\_{i}$$ | **–** | номинальная концентрация протамина сульфата в каждом испытуемом растворе, мг/мл. |

*Относительное стандартное отклонение* антигепариновой активности для каждого испытуемого раствора должно быть не более 5,0 %.

За результат антигепариновой активности принимают среднее значение из 18 определений.

***Белок.***Определение проводят методом ВЭЖХ в условиях испытания «Родственные примеси» со следующими изменениями.

Хроматографируют раствор стандартного образца протамина сульфата и испытуемый раствор.

Содержание протамина сульфата в процентах ($X$) вычисляют по формуле:

$$X=\frac{S\_{1}∙a\_{0}∙P∙100∙100∙100}{S\_{0}∙a\_{1}∙10∙(100-W)∙(100-R)}∙100,$$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | $$S\_{1}$$ | − | среднее значение суммы площадей пиков пептидов A, B, C, D на хроматограмме испытуемого раствора; |
|  | *S*0 | − | среднее значение суммы площадей пиков пептидов A, B, C, D на хроматограмме раствора стандартного образца протамина сульфата; |
|  | $$a\_{1}$$ | − | навеска субстанции, мг; |
|  | $$a\_{0}$$ | − | навеска стандартного образца протамина сульфата, мг; |
|  | $$P$$ | − | содержание протамина в стандартном образце протамина сульфата, мг; |
|  | *W* | − | потеря в массе при высушивании,%; |
|  | $$R$$ | − | содержание сульфатов в субстанции, в %. |

ХРАНЕНИЕ

В герметично укупоренной упаковке, в защищённом от света месте.

\*Приводится для информации.