ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

ФС.2.3.0005

ПРОТАМИНА СУЛЬФАТ

Protamini sulfas

Protamine sulfate

[9009-65-8]

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Сульфатированные формы основных пептидов, состоящие из четырёх химических соединений, экстрагируемые из семенной жидкости или икры рыб семейства лососёвых *Salmonidae*. В растворе он связывается с гепарином, подавляя его антикоагулянтную активность; в условиях проведения испытания на активность данное связывание приводит к образованию осадка.

Содержание: от 90,0 % до 110,0 % в пересчёте на сухое, свободное от серной кислоты вещество.

Активность: 1 мг протамина сульфата осаждает не менее 100 МЕ гепарина в пересчёте на сухое вещество.

ПРОИЗВОДСТВО

Животные, из которых получают протамина сульфат, должны соответствовать требованиям, предъявляемым к здоровью животных, пригодных для употребления в пищу человеком.

СВОЙСТВА

***Описание*:** белый или почти белый гигроскопичный порошок.

***Растворимость*:** умеренно растворима в воде, практически нерастворима в этаноле (96 %).

ПРОЕКТ

ИДЕНТИФИКАЦИЯ

А. **Жидкостная хроматография**

Используют хроматограммы, полученные в испытании *Родственные примеси* в разделе *Испытания*, и рассчитывают относительное содержание каждого из протаминовых пептидов A, B, C и D.

Требования:

– на хроматограмме испытуемого раствора время удерживания основных пиков (протаминовых пептидов A, B, C, D) должно совпадать с временем удерживания основных пиков на хроматограмме раствора сравнения (а);

– содержание протаминового пептида A: 13-18 %;

– содержание протаминового пептида B: 21-28 %;

– содержание протаминового пептида C: 31-38 %;

– содержание протаминового пептида D: 19-24 %;

Б. Испытуемый образец должен давать соответствующую реакцию в испытании *Активность* при количественном определении.

В. Испытуемый образец должен соответствовать требованиям испытания на сульфаты (см. раздел *Испытания*).

ИСПЫТАНИЯ

Раствор S. 0,20 г испытуемого образца растворяют в *воде Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 10,0 мл.

Прозрачность раствора (*ОФС «Прозрачность и степень опалесценции (мутности) жидкостей»*). К 2,5 мл раствора S прибавляют 7,5 мл *воды Р*. Опалесценция полученного раствора не должна превышать опалесценцию суспензии сравнения II.

Цветность раствора (*ОФС «Степень окраски жидкостей», метод II*). Окраска раствора, полученного в испытании *Прозрачность раствора* раздела *Испытания*, не должна быть интенсивнее окраски раствора сравнения BY_6 или Y_6.

ПРОЕКТ

Оптическая плотность (*ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях»*). Не более 0,1. Определение проводят в области длин волн от 260 нм до 280 нм.

2,5 мл раствора S доводят *водой Р* до объёма 5,0 мл.

Родственные примеси. Жидкостная хроматография (*ОФС «Жидкостная хроматография»*) с использованием метода нормализации.

Испытуемый раствор. 30 мг испытуемого образца растворяют в 400 мкл раствора 618 г/л *хлороводородной кислоты Р* и доводят объём раствора раствором 1,03 г/л *хлороводородной кислоты Р* до 100,0 мл.

Раствор сравнения (а). Содержимое флакона с фармакопейным стандартным образцом *протамина сульфата* растворяют в 40 мкл раствора 618 г/л *хлороводородной кислоты Р* и доводят объём раствора раствором 1,03 г/л *хлороводородной кислоты Р* до 10,0 мл.

Раствор сравнения (б). 1,0 мл раствора сравнения (а) доводят раствором 1,03 г/л *хлороводородной кислоты Р* до объёма 50,0 мл.

Условия хроматографирования:

– *колонка*: длиной 0,15 м и внутренним диаметром 4,6 мм; заполненная *силикагелем для хроматографии, октадецилсилильным, с пористой поверхностью на непористой основе, эндкепированным Р*, с размером частиц 3,6 мкм;

– *температура колонки*: 45 °С;

– *подвижные фазы*:

– *подвижная фаза А*: *трифторуксусная кислота Р–ацетонитрил Р1–вода для хроматографии Р* (0,1:5:95 *об/об/об*); дегазируют;

– *подвижная фаза Б*: *трифторуксусная кислота Р–ацетонитрил Р1–вода для хроматографии Р* (0,1:50:50 *об/об/об*); дегазируют;

ПРОЕКТ

– *режим градиентного элюирования*:

Время (мин)	**Подвижная фаза А (*% об/об*)**	**Подвижная фаза Б (*% об/об*)**
0–2	95	5
2–17	95→80	5→20
17–17,2	80→20	20→80
17,2–20	20	80

– *скорость потока*: 1,5 мл/мин;

– *детектор*: спектрофотометрический, длина волны 210 нм;

– *температура автосамплера:* 5 °С;

– *объём вводимой пробы*: 30 мкл.

Относительное удерживание по протаминовому пептиду А (время удерживания – около 9-13 мин): протаминовый пептид В – около 1,05; протаминовый пептид С – около 1,10; протаминовый пептид D – около 1,15.

Пригодность хроматографической системы:

– четыре основных пика (протаминовых пептидов *A, B, C, D*) элюируются в интервале от 8 до 16,5 мин на хроматограмме раствора сравнения (а);

– *разрешение*: не менее 2,0 между каждым из соседних основных пиков на хроматограмме раствора сравнения (а);

– *отношение сигнал/шум*: не менее 10 для пика протаминового пептида А на хроматограмме раствора сравнения (б);

– *фактор симметрии*: не более 1,8 для пика протаминового пептида А, не более 1,5 для пика протаминового пептида В, не более 2,5 для пика протаминового пептида С и не более 2,2 для пика протаминового пептида D на хроматограмме раствора сравнения (а).

Содержание родственных примесей в процентах рассчитывают с помощью следующего выражения (для интегрирования используют метод опускания перпендикуляра):

ПРОЕКТ

$$100 - \left(\frac{r_{\mathrm{A}} + r_B + r_C + r_D}{r_T} \cdot 100\right),$$

где: $r_{\mathrm{A}-D}$ – сумма площадей пиков протаминовых пептидов A, B, C и D на хроматограмме испытуемого раствора;

r_T – сумма площадей всех пиков на хроматограмме испытуемого раствора.

Пределы содержания примесей:

– *сумма примесей*: не более 8,0 %;

– *порог информирования*: 0,50 %.

Сульфаты. От 16 % до 24 % в пересчёте на сухое вещество.

0,150 г испытуемого образца растворяют в 15 мл *воды дистиллированной Р* в химическом стакане. Прибавляют 5 мл *хлороводородной кислоты разбавленной Р*. Нагревают до кипения и медленно прибавляют к кипящему раствору 10 мл раствора 100 г/л *бария хлорида Р*. Накрывают стакан и нагревают на водяной бане в течение одного часа. Фильтруют. Осадок промывают несколько раз небольшим количеством горячей *воды Р*. Остаток сушат и прокаливают при температуре от 550 °С до 650 °С до постоянной массы.

1,0 г остатка соответствует 0,4117 г SO_4.

Железо (*ОФС «Железо», метод 1*). Не более 10 ppm.

1,0 г испытуемого образца растворяют при нагревании в *воде Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 10 мл.

Потеря в массе при высушивании (*ОФС «Потеря в массе при высушивании»*). Не более 5,0 %.

1,000 г испытуемого образца высушивают в сушильном шкафу при температуре 105 °С в течение трёх часов.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Белок. Жидкостная хроматография (*ОФС «Жидкостная хроматография»*) в условиях, описанных в испытании *Родственные примеси* со следующими изменениями.

ПРОЕКТ

Вводимая проба: испытуемый раствор и раствор сравнения (а).

Пригодность хроматографической системы (раствор сравнения (а)):

– *повторяемость*: относительное стандартное отклонение суммарной площади пиков, превышающих порог информирования, не более 2,0 % при относительном удерживании по протаминовому пептиду А в пределах 0,80-1,30, определяется на основании 6 повторных введений.

Содержание протамина по площадям всех пиков, превышающих порог информирования, с относительным удерживанием по протаминовому пептиду А в пределах 0,80-1,30, рассчитывают в процентах с учётом значения содержания протамина в фармакопейном стандартном образце *протамина сульфата*.

Активность

Испытуемый раствор (а). 15 мг испытуемого образца растворяют в *воде Р* доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл.

Испытуемый раствор (б). 2,0 мл испытуемого раствора (а) доводят *водой Р* до объёма 3,0 мл.

Испытуемый раствор (в). 1,0 мл испытуемого раствора (а) доводят *водой Р* до объёма 3,0 мл.

В качестве титранта используют 6-кратно разбавленный фармакопейный стандартный образец *гепарина натрия* в *воде Р* (например, 1,7 мл доводят *водой Р* до объёма 10,0 мл). Титруют каждый испытуемый раствор дважды, как указано далее: точно отмеренный объём титруемого раствора, например 1,5 мл, помещают в кювету подходящего колориметра, устанавливают на приборе подходящую длину волны (не является критической) в видимой области спектра. Небольшими объёмами прибавляют титрант до резкого увеличения оптической плотности и регистрируют объём прибавления титранта.

Проводят три независимых количественных определения. Для каждого отдельного титрования рассчитывают количество Международных единиц гепарина в объёме прибавленного титранта в конечной точке титрования на

ПРОЕКТ

1 мг испытуемого образца. Рассчитывают активность вещества как среднее значение результатов 18 определений. Оценивают линейность отклика обычными статистическими методами (например, *ОФС «Статистическая обработка результатов биологических испытаний лекарственных средств»*). Рассчитывают три стандартных отклонения для результатов каждого из трёх независимых количественных определений. Результаты испытания являются достоверными, если каждое из шести стандартных отклонений составляет менее 5 % от среднего значения.

ХРАНЕНИЕ

В герметично укупоренной упаковке с контролем первого вскрытия. Если субстанция является стерильной, упаковка также должна быть стерильной, герметично укупоренной и с контролем первого вскрытия.

ПРОЕКТ