

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

МЕТОД ЭКСКЛЮЗИОННОЙ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Описание приготовления растворов испытуемых и стандартных образцов, подвижной фазы и требования к пригодности хроматографической системы и расчёты разработанной универсальной методики определения содержания высокомолекулярных примесей

Описание приготовления подвижной фазы, пробоподготовка образцов МАТ и стандартных образцов

Пробоподготовка образцов ЛС

Подвижная фаза (ПФ). В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещали 10,5 г калия гидрофосфата, 19,1 г калия дигидрофосфата и 18,6 г калия хлорида, растворяли в 800 мл воды и доводили объем водой до метки (рН 6,2 ± 0,1); фильтровали через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм или менее. Срок годности раствора – 7 сут при комнатной температуре или 14 сут при хранении при температуре 2–8 °С.

Испытуемый раствор. Готовили раствор испытуемого образца с конечной концентрацией МАТ 10 мг/мл. В качестве растворителя использовали ПФ. В случаях, когда концентрация белка в испытуемом препарате была менее 10 мг/мл, увеличивали объем вводимой пробы.

Раствор сравнения 1. Готовили раствор СО МАТ с конечной концентрацией 10 мг/мл. В качестве растворителя использовали ПФ. Содержание ВМС находилось в диапазоне от предела количественного определения до нормируемой концентрации содержания ВМС в ЛС.

Раствор для оценки чувствительности хроматографической системы. В мерную колбу вместимостью 25 мл помещали 25 мкл раствора сравнения 1 и доводили объем подвижной фазой до метки (концентрация МАТ в растворе соответствовала 0,1 % от его концентрации в испытуемом растворе). Срок годности раствора – 8 ч при хранении при температуре 2–8 °С.

Раствор сравнения 2 (раствор стандартов-маркеров молекулярной массы). Готовили раствор сравнения маркеров молекулярной массы из веществ-маркеров молекулярной массы в воде. Раствор, содержащий 5 стандартов-маркеров, готовили в следующей их концентрации: тиреоглобулин (около 5 мг/мл), бычий гамма-глобулин (около 5 мг/мл), куриный овальбумин (около 5 мг/мл), лошадиный миоглобин (около 2,5 мг/мл) и витамин В12 (около 0,5 мг/мл). К 50 мкл полученного раствора добавляли 950 мкл подвижной фазы, перемешивали.

Сроки годности испытуемого раствора, растворов сравнения 1 и 2, раствора плацебо составляли 1 сут при хранении при температуре 2–8 °С. Срок годности,

превышающий указанное время, устанавливали в ходе верификации и/или валидации методики для конкретного МАТ.

Контрольный раствор. В качестве контрольного раствора использовали подвижную фазу.

Раствор плацебо. В качестве раствора плацебо использовали рецептурный буферный раствор, содержащий все компоненты готового нерасфасованного продукта или АФС или ЛП (за исключением МАТ) и разведенный аналогично испытуемому раствору.

Расчеты содержания высокомолекулярных соединений в испытуемом образце

Содержание высокомолекулярных соединений в образце (X, %) вычисляли по формуле (1):

$$X = \frac{\sum S_i \times 100}{\sum S}, \quad (1)$$

где $\sum S_i$ – сумма площадей пиков, отнесенных к высокомолекулярным соединениям, на хроматограмме испытуемого раствора; $\sum S$ – сумма площадей всех аналитически значимых пиков на хроматограмме испытуемого раствора

Содержание мономера в образце (X, %) вычисляли по формуле (2):

$$X = \frac{S_y \times 100}{\sum S}, \quad (2)$$

где S_y – площадь пика мономера на хроматограмме испытуемого раствора; $\sum S$ – сумма площадей всех аналитически значимых пиков на хроматограмме испытуемого раствора.

Требования к пригодности хроматографической системы при определении содержания высокомолекулярных соединений в образцах МАТ с использованием метода эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии

Хроматографический профиль раствора сравнения 2 (порядок элюирования пиков и их относительные высоты) визуально должен соответствовать типичной хроматограмме, представленной на рис. 5 (Приложение 1). Оценка разделительной способности и воспроизводимости используемой хроматографической системы выполняется с использованием раствора сравнения 1. Примеры хроматограмм растворов сравнения 1 для оценки разделительной способности различных МАТ приведены на рис. 6 и 7 (Приложение

1) На хроматограмме контрольного раствора и раствора плацебо должны отсутствовать значимые пики со временем удерживания меньше, чем время удерживания пика витамина В12 на хроматограмме раствора сравнения 2 и пиков компонентов плацебо. Значимым считается пик с площадью ≥ 0,1% от средней общей площади всех оцениваемых (аналитиче-

ски значимых) пиков на хроматограммах раствора сравнения 1.

2) На хроматограмме раствора для оценки чувствительности хроматографической системы отношение сигнал/шум для пика мономера должно составлять не менее 10.

3) На хроматограмме раствора сравнения 1:

- хроматографический профиль раствора сравнения 1 должен содержать пик мономера и предшествующий ему пик (пики) высокомолекулярных соединений;

- относительное стандартное отклонение (RSD) времени удерживания пика мономера для трех последовательных вводов раствора сравнения 1 в начале хроматографической последовательности должно быть не более 2,0%;

- RSD времени удерживания пика мономера для всех вводов раствора сравнения 1 должно быть не более 3,0%;

- RSD площади пика мономера для трех последовательных вводов раствора сравнения 1 в начале хроматографической последовательности должно быть не более 2,0%;

- RSD площади пика мономера для всех вводов раствора сравнения 1 должно быть не более 3,0%;

- отношение пик/долина (p/v), рассчитанное для пика мономера и предшествующего ему пика, – не менее 1,05. В случае, если разделение пиков наблюдается до базовой линии, то вместо p/v оценивают разрешение между пиком агрегатов и пиком мономера, которое должно быть не менее 1,5;

- фактор асимметрии пика мономера – не менее 0,8 и не более 2,0.

4) На хроматограмме раствора сравнения 2 (раствора стандартов-маркеров молекулярной массы):

- на хроматограмме раствора сравнения 2 присутствуют все пики, соответствующие используемым маркерам молекулярных масс;

- все стандарты-маркеры должны элюироваться в порядке уменьшения их молекулярных масс;

- в случае использования набора из пяти стандартов-маркеров (тиреоглобулин, бычий гамма-глобулин, куриный овальбумин, лошадиный миоглобин и витамин B12) хроматографический профиль раствора сравнения 2 (порядок элюирования пиков и их относительные высоты) визуально должен соответствовать типичной хроматограмме, представленной на рис. 5 (Приложение 1);

- разрешение между пиками гамма-глобулина и овальбумина – не менее 2,5;

число теоретических тарелок (N), рассчитанное для пика витамина B12 – не менее 20000;

- фактор асимметрии пика, соответствующего мио-

глобину – не менее 0,8 и не более 1,5.

Приведенные требования к критериям пригодности хроматографической системы являются минимальными и могут быть ужесточены в случае получения в ходе верификации данной методики лучших, по сравнению с приведенными, значений.

Оценка пригодности хроматографической колонки для целей методики и оценка эффективности колонки выполняется с использованием раствора сравнения 2 (раствор стандартов-маркеров молекулярной массы). Оценка разделительной способности и воспроизводимости используемой хроматографической системы выполняется с использованием раствора сравнения 1 (рис. 6 и 7, Приложение 1).

МЕТОД КАПИЛЛЯРНОГО ГЕЛЬ-ЭЛЕКТРОФЕРЕЗА

Описание приготовления растворов испытуемых и стандартных образцов в невозстанавливающих и восстанавливающих условиях, программы предварительного кондиционирования капилляра, разделения, промывки капилляра после проведения анализа, требования к пригодности электрофоретической системы и расчёты в невозстанавливающих и восстанавливающих условиях, разработанной универсальной методики определения содержания низкомолекулярных примесей (фрагментов) и негликозилированных частей молекул

Описание приготовления растворов реактивов, пробоподготовка образцов МАТ и стандартных образцов

SDS буфер для образцов. Готовили раствор, содержащий 100 мМ трис(гидроксиметил)аминометана гидрохлорида, pH 9,0 и 1% натрия додецилсульфата.

SDS гелевый буфер. Буферный раствор трис(гидроксиметил)аминометана с pH 8,0, содержащий 0,2% натрия додецилсульфата, 10% глицерина, 2 мМ ЭДТА и борат-связанный полимер декстрана (например, декстан 2000000).

Раствор для алкилирования 1. 250 мМ йодацетамида в воде, приготовленный непосредственно перед использованием.

Раствор для алкилирования 2. 500 мМ йодацетамида в воде, приготовленный непосредственно перед использованием.

Внутренний раствор сравнения 5 мг/мл. Раствор внутреннего СО, представляющий собой белок с молекулярной массой 10 кДа в воде, содержащей 0,5% натрия додецилсульфата и 0,2% натрия азида.

Раствор плацебо. В качестве раствора плацебо использовали рецептурный буферный раствор, содержащий все компоненты готового нерасфасованного продукта или АФС или ЛП, за исключением МАТ.

Невосстановленный испытуемый раствор. Аликвоту раствора исследуемого образца (или предварительно подготовленного исследуемого образца), содержащего 100 мкг МАТ, разбавляли с использованием

50–94 мкл SDS буфера для образцов до получения конечного объема 95 мкл, для получения раствора, содержащего МАТ в концентрации 1 мг/мл (в случае выявления недостаточной чувствительности электрофоретической системы итоговая концентрация раствора может быть увеличена до 2 мг/мл, для чего используют аликвоту раствора исследуемого образца, содержащего 200 мкг МАТ). При приготовлении указанного раствора аликвота испытуемого образца должна быть не менее 1 мкл, прибавляемый объем SDS буфера для образцов должен составлять не менее 50% общего приготавливаемого объема раствора. К 95 мкл полученного раствора добавляли 2 мкл внутреннего раствора сравнения и 5 мкл раствора для алкилирования ¹. Перемешивали и нагревали смесь при температуре 70 °С в течение 3 мин². Охлаждали в течение 3 мин при комнатной температуре, центрифугировали при 300×g в течение 1 мин и помещали по 100 мкл во флаконы для автоматического отбора проб.

Восстановленный испытуемый раствор. Аликвоту раствора исследуемого образца (или предварительно подготовленного исследуемого образца), содержащего 100 мкг МАТ, разбавляли с использованием 50–94 мкл SDS буфера для образцов до получения конечного объема 95 мкл, для получения раствора, содержащего МАТ в концентрации 1 мг/мл (в случае выявления недостаточной чувствительности электрофоретической системы итоговая концентрация раствора может быть увеличена до 2 мг/мл, для чего используют аликвоту раствора исследуемого образца, содержащего 200 мкг МАТ).

При приготовлении указанного раствора аликвота испытуемого образца должна быть не менее 1 мкл, прибавляемый объем SDS буфера для образцов должен составлять не менее 50% общего приготавливаемого объема раствора. К 95 мкл полученного раствора добавляли 2 мкл внутреннего раствора сравнения и 5 мкл 2-меркаптоэтанола. Перемешивали и нагревали смесь при температуре 100 °С в течение 3 мин³. Охлаждали в течение 3 мин при комнатной температуре, центрифугировали при 300g в течение 1 мин и помещали по 100 мкл во флаконы для автоматического отбора проб.

Невосстановленный раствор сравнения. Разбавляли СО, содержащий 100 мкг МАТ, с использованием 50–94 мкл SDS буфера для образцов до получения конечного объема 95 мкл для получения раствора, содержащего МАТ в концентрации 1 мг/мл (в случае выявления недостаточной чувствительности электрофоретической системы итоговая концентрация

раствора может быть увеличена до 2 мг/мл, для чего используют аликвоту раствора исследуемого образца, содержащего 200 мкг МАТ).

При приготовлении указанного раствора аликвота СО должна быть не менее 1 мкл, прибавляемый объем SDS буфера для образцов должен составлять не менее 50% общего приготавливаемого объема раствора. К 95 мкл полученного раствора добавляли 2 мкл внутреннего стандартного раствора и 5 мкл раствора для алкилирования ⁴. Перемешивали и нагревали смесь при температуре 70 °С в течение 3 мин⁵. Охлаждали в течение 3 минут при комнатной температуре, центрифугировали при 300g в течение 1 мин и помещали по 100 мкл во флаконы для автоматического отбора проб.

Невосстановленный раствор для проверки пригодности электрофоретической системы. Разбавляли СО с помощью SDS буфера для образцов до концентрации белка, соответствующей невосстановленному раствору сравнения. К 95 мкл полученного раствора добавляли 2 мкл внутреннего стандартного раствора и 5 мкл раствора для алкилирования ⁶. Перемешивали и нагревали смесь при температуре 70 °С в течение 60 мин⁷. Охлаждали в течение 5 мин при комнатной температуре, центрифугировали при 300g в течение 1 мин и помещали по 100 мкл во флаконы для автоматического отбора проб.

Восстановленный раствор сравнения. Разбавляют СО, содержащий 100 мкг МАТ, с использованием 50–94 мкл SDS буфера для образцов до получения конечного объема 95 мкл для получения раствора, содержащего МАТ в концентрации 1 мг/мл (в случае выявления недостаточной чувствительности электрофоретической системы итоговая концентрация раствора может быть увеличена до 2 мг/мл, для чего использовали аликвоту раствора исследуемого образца, содержащего 200 мкг МАТ).

При приготовлении указанного раствора аликвота раствора СО должна быть не менее 1 мкл, прибавляемый объем SDS буфера для образцов должен составлять не менее 50 % общего приготавливаемого объема раствора. К 95 мкл полученного раствора добавляли 2 мкл внутреннего раствора сравнения и 5 мкл 2-меркаптоэтанола. Перемешивали и нагревали смесь при температуре 100 °С в течение 3 мин⁸. Охлаждали в течение 3 мин при комнатной температуре, центрифугировали при 300g в течение 1 мин и помещали по 100 мкл во флаконы для автоматического отбора проб.

Раствор для оценки чувствительности в невосста-

¹ Для конкретных объектов может быть использован раствор для алкилирования 2.

² Для конкретных объектов могут быть подобраны иные оптимальные условия температурной обработки.

³ Для конкретных объектов могут быть подобраны иные оптимальные условия температурной обработки.

⁴ Для конкретных объектов может быть использован раствор для алкилирования 2.

⁵ Для конкретных объектов могут быть подобраны иные оптимальные условия температурной обработки.

⁶ Для конкретных объектов может быть использован раствор для алкилирования 2.

⁷ Для конкретных объектов могут быть подобраны иные оптимальные условия температурной обработки.

⁸ Для конкретных объектов могут быть подобраны иные оптимальные условия температурной обработки.

навливающих условиях. Разбавляли СО, содержащий МАТ, SDS буфером для образцов до концентрации МАТ составляющей 0,5% от концентрации испытуемого раствора. К 95 мкл полученного раствора добавляют 2 мкл внутреннего раствора сравнения и 5 мкл раствора для алкилирования ⁹. Перемешивали и нагревали смесь при температуре 70 °С в течение 3 мин¹⁰. Охлаждали в течение 3 мин при комнатной температуре, центрифугировали при 300g в течение 1 мин и помещали по 100 мкл во флаконы для автоматического отбора проб.

Раствор для оценки чувствительности в восстанавливающих условиях. Разбавляли СО, содержащий МАТ, SDS буфером для образцов до концентрации МАТ, составляющей 0,75% от концентрации испытуемого раствора. К 95 мкл полученного раствора добавляли 2 мкл внутреннего раствора сравнения и 5 мкл 2-меркаптоэтанола. Перемешивали и нагревали смесь при температуре 100 °С в течение 3 мин¹¹. Охлаждали в течение 3 мин при комнатной температуре, центрифугировали при 300g в течение 1 мин и помещали по 100 мкл во флаконы для автоматического отбора проб.

В некоторых случаях при приготовлении испытуемого раствора, раствора сравнения и раствора для оценки чувствительности в невосстанавливающих и восстанавливающих условиях до этапа алиquotирования образца, содержащего необходимое количество МАТ, и разбавления его с помощью SDS

буфера для образцов требовалась предварительная подготовка. Если исследуемый образец представлял собой лиофилизат, его восстанавливали, как описано в инструкции по медицинскому применению. Если исследуемый образец представлял собой концентрированный раствор, при необходимости, проводили его предварительное разбавление водой для получения раствора оптимальной концентрации. Если исследуемый образец содержал МАТ в низкой концентрации, при необходимости, проводили его концентрирование подходящим валидированным способом до получения оптимальной концентрации.

Невосстановленный холостой раствор. К 95 мкл SDS буфера для образцов добавляли 2 мкл внутреннего раствора сравнения и 5 мкл раствора для алкилирования ¹². Перемешивали и нагревали смесь при температуре 70°С в течение 3 мин¹³. Охлаждали в течение 3 мин при комнатной температуре, центрифугировали при 300g в течение 1 мин и помещали по 100 мкл во флаконы для автоматического отбора проб.

Восстановленный холостой раствор. К 95 мкл SDS буфера для образцов добавляли 2 мкл внутреннего раствора сравнения и 5 мкл 2-меркаптоэтанола. Перемешивали и нагревали смесь при температуре 100°С в течение 3 мин. Охлаждали в течение 3 мин при комнатной температуре, центрифугировали при 300g в течение 1 мин и помещали по 100 мкл во флаконы для автоматического отбора проб.

Таблица 1. Программа предварительной промывки капилляра (кондиционирование)

Действие	Значение	Время	Флакон на входе	Флакон на выходе	Примечание
Промывание под давлением	20 psi	10 мин	0,1 М раствор натрия гидроксида	Вода (слив)	Прямой режим
Промывание под давлением	20 psi	5 мин	Раствор 0,1 М хлористоводородной кислоты	Вода (слив)	Прямой режим
Промывание под давлением	20 psi	2 мин	Вода	Вода (слив)	Прямой режим
Промывание под давлением	70 psi	10 мин	SDS-гель буферный раствор	Вода (слив)	Прямой режим
Разделение под напряжением и давлением	15 кВ (Ramp time 1 мин), 20 psi на оба конца капилляра	10 мин	SDS-гель буферный раствор	SDS-гель буферный раствор	Обратная полярность

⁹ Для конкретных объектов может быть использован раствор для алкилирования 2.

¹⁰ Для конкретных объектов могут быть подобраны иные оптимальные условия температурной обработки.

¹¹ Для конкретных объектов могут быть подобраны иные оптимальные условия температурной обработки.

¹² Для конкретных объектов может быть использован раствор для алкилирования 2.

¹³ Для конкретных объектов могут быть подобраны иные оптимальные условия температурной обработки.

Таблица 2. Программа разделения в невосстанавливающих и восстанавливающих условиях

Действие	Значение	Время	Флакон на входе	Флакон на выходе	Примечание
Промывание под давлением	70 psi	3 мин	0,1 М раствор натрия гидроксида	Вода (слив)	Прямой режим
Промывание под давлением	70 psi	1 мин	Раствор 0,1 М хлористоводородной кислоты	Вода (слив)	Прямой режим
Промывание под давлением	70 psi	1 мин	Вода	Вода (слив)	Прямой режим
Промывание под давлением	70 psi	10 мин	SDS-гель буферный раствор	Вода (слив)	Прямой режим
Ожидание	–	0 мин	Вода	Вода	Очистка концов капилляра
Ввод пробы под напряжением	5 кВ	20 с	Анализируемый образец	SDS-гель буферный раствор	Обратная полярность
Ожидание	–	0 мин	Вода	Вода	Очистка концов капилляра
Разделение под напряжением и давлением	15 кВ (Ramp time 1 мин), 20 psi на оба конца капилляра, автообнуление на 5 мин	30 мин ¹⁴	SDS-гель буферный раствор	SDS-гель буферный раствор	Обратная полярность

Таблица 3. Программа промывки капилляра после завершения анализа

Действие	Значение	Время	Флакон на входе	Флакон на выходе	Примечание
Промывание под давлением	70 psi	10 мин	0,1 М раствор натрия гидроксида	Вода (слив)	Прямой режим
Промывание под давлением	50 psi	5 мин	Раствор 0,1 М хлористоводородной кислоты	Вода (слив)	Прямой режим
Промывание под давлением	50 psi	2 мин	Вода	Вода (слив)	Прямой режим
Промывание под давлением	70 psi	10 мин	SDS-гель буферный раствор	Вода (слив)	Прямой режим
Разделение под напряжением и давлением	15 кВ (Ramp time 1 мин), 20 psi на оба конца капилляра	10 мин	SDS-гель буферный раствор	SDS-гель буферный раствор	Обратная полярность
Ожидание	–	0 мин	Вода	Вода	Очистка концов капилляра
Выключение лампы	–	–	–	–	–

Расчеты

Невосстанавливающие условия

Содержание основного пика (X, %) вычисляли по формуле (3):

$$X = \frac{S_{\text{оп}} \times 100}{\Sigma S}, \quad (3)$$

где $S_{\text{оп}}$ – скорректированная площадь основного пика на электрофореграмме невосстановленного испытуемого раствора; ΣS – сумма скорректированных площадей всех пиков, принимаемых в расчет, на электрофореграмме невосстановленного испытуемого раствора.

Содержание любой единичной примеси (Y, %) вычисляли по формуле (4):

$$Y = \frac{S_i \times 100}{\Sigma S}, \quad (4)$$

где S_i – скорректированная площадь пика i -ой примеси на электрофореграмме невосстановленного испытуемого раствора; ΣS – сумма скорректированных площадей всех пиков, принимаемых в расчет, на электрофореграмме невосстановленного испытуемого раствора

Сумма примесей определяется как арифметическая сумма содержания всех единичных примесей.

Восстанавливающие условия

Суммарное содержание легкой и тяжелой цепи образца (X, %) вычисляли по формуле (5):

$$X = \frac{S_{\text{лц}} + S_{\text{тц}}}{\Sigma S} \times 100, \quad (5)$$

где $S_{\text{лц}}$ – скорректированная площадь пика легкой цепи на электрофореграмме восстановленного испытуемого раствора; $S_{\text{тц}}$ – скорректированная

¹⁴ Изначальные параметры программы разделения в невосстанавливающих и восстанавливающих условиях

площадь пика тяжелой цепи на электрофореграмме восстановленного испытуемого раствора; ΣS – сумма скорректированных площадей всех пиков, принимаемых в расчет, на электрофореграмме восстановленного испытуемого раствора.

Содержание любой единичной примеси образца (Y, %) вычисляли по формуле (6):

$$X = \frac{S_i \times 100}{\Sigma S}, \quad (6)$$

где S_i – скорректированная площадь пика i -ой примеси на электрофореграмме восстановленного испытуемого раствора; ΣS – сумма скорректированных площадей всех пиков, принимаемых в расчет, на электрофореграмме восстановленного испытуемого раствора.

Сумма примесей определялась как арифметическая сумма содержания всех единичных примесей.

Требования к пригодности электрофоретической системы при определении содержания низкомолекулярных соединений (фрагментов) и негликозилированных частей молекул в образцах МАТ с использованием метода капиллярного гель-электрофореза в невосстанавливающих и восстанавливающих условиях

Невосстанавливающие условия

- на электрофореграмме невосстановленного холостого раствора отсутствуют пики в интервале времен миграции целевых пиков (от пика внутреннего СО 10 кДа);
- на электрофореграмме невосстановленного раствора для проверки пригодности электрофоретической системы:
 - отношение пик/долина (p/v) между основным пиком и ближайшим к нему пиком примеси должно быть не менее 1,1;
- на электрофореграмме невосстановленного раствора сравнения:
 - должен обнаруживаться пик внутреннего СО 10 кДа со временем миграции менее 14,0 мин;
 - относительное стандартное отклонение скорректированной площади основного пика для всех вводов невосстановленного раствора сравнения должно быть не более 5,0%;
 - относительное стандартное отклонение времени миграции основного пика для всех вводов невосстановленного раствора сравнения должно быть не

более 5,0%;

- фактор симметричности основного пика должен быть не более 4,5;
- кажущееся число теоретических тарелок, рассчитанное по пику тяжелой цепи, должно быть не менее 10000;
- на электрофореграмме раствора для оценки чувствительности в невосстанавливающих условиях:
 - отношение сигнал/шум для основного пика должно быть не менее 10.

Восстанавливающие условия

- на электрофореграмме восстановленного холостого раствора отсутствуют пики в интервале времен миграции целевых пиков (после пика внутреннего СО 10 кДа);
- на электрофореграмме восстановленного раствора сравнения:
 - должен обнаруживаться пик внутреннего СО 10 кДа со временем миграции менее 14,0 мин;
 - относительное стандартное отклонение скорректированной площади пика тяжелой цепи для всех вводов восстановленного раствора сравнения должно быть не более 5,0%;
 - относительное стандартное отклонение времени миграции пика тяжелой цепи для всех вводов восстановленного раствора сравнения должно быть не более 5,0%;
 - разрешение между пиками тяжелой и легкой цепи должно быть не менее 7,0;
 - разрешение между пиками тяжелой цепи и пиком тяжелой негликозилированной цепи должно быть не менее 1,5 (дополнительный критерий оценки раздельной способности системы, используется при необходимости);
 - фактор симметричности пика тяжелой цепи должен быть не более 4,5.
 - кажущееся число теоретических тарелок, рассчитанное по пику тяжелой цепи, должно быть не менее 10000.
 - на электрофореграмме раствора для оценки чувствительности в восстанавливающих условиях:
 - отношение сигнал/шум для пика тяжелой цепи должно быть не менее 10.