**Панкреатин ФС**

**Панкреатин**

**Pancreatinum Взамен ФС 42-3647-98**

Ферментный препарат из поджелудочной железы свиней и крупного рогатого скота.

Субстанция должна обладать:

– амилолитической активностью не менее 35,0 ЕД/мг;

– липолитической активностью не менее 43,0 ЕД/мг;

– протеолитической активностью не менее 2,8ЕД/мг.

**Описание.** От светло-жёлто-коричневого до светло-коричневого цвета аморфный порошок со слабым характерным запахом.

**Растворимость.** Мало растворим в воде и практически нерастворим в спирте 96 %.

**Подлинность.** *1.* *Амилолитическая активность*. Препарат обладает амилолитической активностью (раздел «Количественное определение»).

*2.* *Липолитическая активность*. Препарат обладает липолитической активностью (раздел «Количественное определение»).

*3.* *Протеолитическая активность*. Препарат обладает протеолитической активностью (раздел «Количественное определение»).

**Содержание жира.** Не более 3,0 %. Определение проводят гравиметрически.

Около 1,0 г (точная навеска) субстанции помещают в коническую колбу вместимостью 250 мл с обратным холодильником и экстрагируют 100 мл петролейного эфира при постоянном перемешивании или в приборе типа Сокслет в течение 3 ч. Раствор фильтруют через бумажный фильтр, смоченный экстрагентом. Фильтрат помещают в круглодонную колбу, предварительно доведённую до постоянной массы и выпаривают досуха в вакууме при нагревании на водяной бане до температуры 32,5±2,5 °С. Остаток высушивают в течение 2 ч при температуре 102,5±2,5 °С. Масса остатка не должна превышать 30 мг.

**Потеря в массе при высушивании.** Не более 5 % (ОФС «Потеря в массе при высушивании», способ 1). Около 0,5 г (точная навеска) субстанции высушивают в течение 4 ч в вакууме при температуре 60±2 °С и остаточном давлении не более 5,0 мм рт.ст.

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

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

Количественное определение

*1. Амилолитическая активность*. Определение проводят методом титриметрии.

*Раствор серной кислоты*. Серная кислота концентрированная – вода 1:5.

*Испытуемая суспензия*. Точную навеску субстанции, соответствующую около 7500 ЕД амилазы, помещают в охлажденную ступку и растирают с 3 мл охлажденного до температуры 5±3 °С фосфатного буферного раствора pH 6,8 (1) до получения тонкой суспензии. С помощью того же буферного раствора полученную суспензию количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объём суспензии охлажденным фосфатным буферным раствором pH 6,8 (1) до метки. 10,0 мл полученной суспензии переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят объём суспензии охлажденным фосфатным буферным раствором pH 6,8 (1) до метки.

*Стандартная суспензия*. Точную навеску стандартного образца панкреатина, соответствующую около 3000 ЕД амилазы, помещают в охлаждённую ступку и растирают с 3 мл охлажденного до температуры 5±3 °С фосфатного буферного раствора pH 6,8 (1) до получения тонкой суспензии. С помощью того же буферного раствора полученную суспензию количественно переносят в мерную колбу вместимостью 200 мл, доводят объём суспензии охлажденным фосфатным буферным раствором pH 6,8 (1) до метки.

Четыре конические колбы вместимостью 300 мл, снабженные притертыми стеклянными пробками, маркируют:

– S и U (основной опыт);

– BS и BU (контрольный опыт).

В каждую колбу помещают по 25 мл 1 % раствора крахмала, 10 мл фосфатного буферного раствора pH 6,8 (1) и 1,0 мл 0,2 М раствора натрия хлорида, закрывают пробками и перемешивают. Колбы выдерживают около 5 мин на водяной бане при температуре 25±0,1 °С для выравнивания их температур.

К содержимому колб BU и BS прибавляют 2,0 мл 1 М раствора хлористоводородной кислоты, перемешивают и возвращают колбы на водяную баню.

К содержимому колб U и BU прибавляют по 1,0 мл испытуемой суспензии, перемешивают и возвращают колбы на водяную баню.

К содержимому колб S и BS прибавляют по 1,0 мл стандартной суспензии, перемешивают и возвращают колбы на водяную баню.

Через 10 мин (точное время) после прибавления фермента к содержимому колб S и U прибавляют по 2,0 мл 1 М раствора хлористоводородной кислоты, перемешивают и прекращают нагревание.

К содержимому всех колб при непрерывном помешивании прибавляют по 10,0 мл 0,05 М раствора йода и сразу же прибавляют 45,0 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида. Колбы выдерживают в течение 15 мин в тёмном месте при температуре от 15 до 25 °С.

В каждую колбу прибавляют по 4,0 мл раствора серной кислоты и титруют избыток йода 0,1 М раствором натрия тиосульфата, используя микробюретку, до исчезновения окраски титруемой суспензии.

Амилолитическую активность в ЕД/мг (Aa) вычисляют по формуле:



|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *V* | − | объём 0,1 М раствора натрия тиосульфата, израсходованный на титрование испытуемой суспензии в основном опыте, мл; |
|  | *V0* | – | объём 0,1 М раствора натрия тиосульфата, израсходованный на титрование стандартной суспензии в основном опыте, мл; |
|  | *V*1 | − | объём 0,1 М раствора натрия тиосульфата, израсходованный на титрование испытуемой суспензии в контрольном опыте, мл; |
|  | *V2* | – | объём 0,1 М раствора натрия тиосульфата, израсходованный на титрование стандартной суспензии в контрольном опыте, мл; |
|  | *A*0 | − | амилолитическая активность стандартного образца панкреатина, ЕД/мг; |
|  | *a* | − | навеска субстанции, мг; |
|  | *a0* | – | навеска стандартного образца панкреатина, мг. |

*2. Липолитическая активность*. Определение проводят методом титриметрии. Испытание проводят в среде азота.

*Эмульсия оливкового масла*. 20 мл оливкового масла помещают в мерный цилиндр вместимостью 500 мл, прибавляют 165 мл раствора гуммиарабика 10 % и 15 мл воды. В цилиндр помещают мешалку и охлаждают до температуры 5 °С. Эмульгирование производят при средней скорости перемешивания 20000 об/мин в течение 30 мин, поддерживая температуру ниже 15 °С.

Эмульсию хранят в полиэтиленовых ёмкостях при температуре от 2 до 8 °С не более 14 дней. Эмульсия не должна расслаиваться. Не менее 90 % капель эмульсии должны иметь диаметр менее 3 мкм, и не должно быть капель с диаметром больше 10 мкм.

*Раствор натрия таурохолата 8 %*. Около 4,0 г (точная навеска) стандартного образца натрия таурохолата помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в воде, доводят объём раствора тем же растворителем до метки. Раствор используют свежеприготовленным.

*Трис-буферный раствор*. Около 60,6 мг (точная навеска) трис(гидроксиметил)аминометана и около 0,234 г (точная навеска) натрия хлорида помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в воде и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

*Эмульсионный субстрат*. В ёмкость из полиэтилена вместимостью 500 мл помещают 100 мл эмульсии оливкового масла, 80 мл трис-буферного раствора, 20 мл раствора натрия таурохолата 8 % и 95 мл воды, охлаждают смесь до температуры 5 °С. В ёмкость помещают мешалку и охлаждают содержимое до температуры 5 °С. Эмульгирование производят при средней скорости перемешивания 13000 об./мин в течение 30 мин, поддерживая температуру ниже 15 °С. Эмульсию используют свежеприготовленной.

*Испытуемая суспензия*. Точную навеску растёртой субстанции, эквивалентную около 5000 ЕД липазы, растирают в течение 5 мин в предварительно охлажденной до температуры 0–4 °С фарфоровой ступке с 2 мл охлажденного до такой же температуры малеатного буферного раствора pH 7,0. Полученную суспензию количественно переносят в мерную колбу вместимостью 250 мл с помощью того же растворителя, доводят объём суспензии малеатным буферным раствором pH 7,0 до метки.

*Стандартная суспензия*. Точную навеску стандартного образца панкреатина, эквивалентную около 5000 ЕД липазы, растирают в течение 5 мин в предварительно охлажденной до температуры 0–4 °С фарфоровой ступке с 2 мл охлажденного до такой же температуры малеатного буферного раствора pH 7,0. Полученную суспензию количественно переносят в мерную колбу вместимостью 250 мл с помощью того же растворителя, доводят объём суспензии малеатным буферным раствором pH 7,0 до метки.

Титрование проводят сразу после приготовления испытуемой и стандартной суспензии.

29,5 мл эмульсионного субстрата помещают в термостатируемый реакционный сосуд вместимостью 50 мл. Уравновешивают температуру при 37±0,2 °С. Сосуд соединяют с электродами, мешалкой и бюреткой, кончик которой погружают в эмульсию оливкового масла, закрывают крышку. При перемешивании осторожно прибавляют 0,1 М раствора натрия гидроксида, доводят pH до 9,0±0,05. Вносят 0,5 мл стандартной суспензии, непрерывно прибавляют 0,1 М раствора натрия гидроксида для поддержания величины на уровне 9,0. Измерение проводят в течение 5 мин (точное время). После каждой целой минуты отмечают объём израсходованного 0,1 М раствора натрия гидроксида. Результаты, полученные на первой минуте, не учитывают, по результатам последующих четырех минут вычисляют средний объём прибавленного раствора натрия гидроксида (S1) за 1 мин.

По окончании измерений сосуд очищают и троекратно промывают водой.

Повторяют еще 2 серии измерений (S2 и S3), вычисляют среднее значение (S).

По результатам трёх серий среднее значение израсходованного 0,1 М раствора натрия гидроксида должно составлять около 0,12±0,04 мл/мин.

Аналогично проводят три серии определений испытуемой суспензии (T1, T2 и T3), вычисляют среднее значение (Т). Если количество израсходованного 0,1 М раствора натрия гидроксида выходит за пределы диапазона 0,08-0,16 мл/мин, то определения повторяют с большим или меньшим количеством испытуемой суспензии, изменяя ее количество от 0,4 мл до 0,6 мл.

Липолитическую активность в ЕД/мг (AL) вычисляют по формуле:

$$X=\frac{V\_{1}∙a\_{0}∙A∙250∙0,5}{V\_{0}∙a\_{1}∙250∙0,5}=\frac{V\_{1}∙a\_{0}∙A}{V\_{0}∙a\_{1}}$$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *V1* | − | средний объём 0,1 М раствора натрия гидроксида, израсходованный на титрование испытуемой суспензии в минуту, мл; |
|  | *V0* | – | средний объём 0,1 М раствора натрия гидроксида, израсходованный на титрование стандартной суспензии в минуту, мл; |
|  | *a1* | − | навеска испытуемой субстанции, мг; |
|  | *a0* | – | навеска стандартного образца панкреатина, мг; |
|  | *A* | − | липолитическая активность стандартного образца панкреатина, ЕД/мг. |

*3. Протеолитическая активность*. Определение проводят методом спектрофотометрии.

*Раствор энтерокиназы*. Около 25 мг (точная навеска) энтерокиназы помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 3 мл предварительно охлажденного 0,02 М раствора кальция хлорида, перемешивают в течение 5 мин, доводят объём раствора тем же растворителем до метки. Срок годности раствора 1 сутки при температуре от 2 до 8 °С.

*Раствор казеина*. Точную навеску казеина, эквивалентную 1,25 г сухого вещества, помещают в коническую колбу вместимостью 100 мл, суспендируют с 5 мл воды, затем прибавляют 10 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида, перемешивают в течение 1 мин. Затем прибавляют 60 мл воды, перемешивают раствор в течение 4 ч, доводят pH до 8,0±0,05 с помощью 0,1 М раствора натрия гидроксида или 0,1 М раствора хлористоводородной кислоты. Раствор количественно при помощи воды переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объём раствора водой до метки.

*Испытуемая суспензия А*. Точную навеску субстанции, соответствующую около 400 ЕД протеазы, растирают в течение 5 мин в предварительно охлажденной до температуры 0–5 °С фарфоровой ступке с 1 мл охлажденного до той же температуры 0,02 М раствора кальция хлорида, постепенно прибавляя 25 мл того же растворителя. Раствор количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл при помощи 0,02 М раствора кальция хлорида, доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

*Испытуемая суспензия Б*. 10,0 мл испытуемой суспензии А и 10,0 мл раствора энтерокиназы помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объём раствора боратным буферным раствором pH 7,5 до метки. Колбу плотно закрывают и нагревают на водяной бане, нагретой до температуры 35±0,2 °С, на 15 мин. Затем раствор охлаждают до температуры 8 °С. 8,0 мл полученного раствора (V1) помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объём раствора холодным боратным буферным раствором pH 7,5 до метки. Срок годности раствора – 1 ч при температуре от 2 до 8 °С.

*Стандартная суспензия А*. Точную навеску стандартного образца панкреатина, эквивалентную около 80 ЕД протеазы, растирают в течение 5 мин в предварительно охлажденной до температуры 0–5 °С фарфоровой ступке с 1 мл охлажденного до той же температуры 0,02 М раствора кальция хлорида, постепенно прибавляя 25 мл того же растворителя. Раствор количественно переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл при помощи 0,02 М раствора кальция хлорида, доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

*Стандартная суспензия Б*. 4,0 мл стандартной суспензии А помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объём раствора боратным буферным раствором pH 7,5 до метки. Срок годности раствора – 1 ч при температуре от 2 до 8 °С.

Для определения используют пробирки, маркированные: T, Tb, S1, S1b, S2, S2b, S3, S3b и B.

В пробирки помещают следующее количество боратного буферного раствора pH 7,5: B – 3,0 мл, S1 и S1b – по 2 мл, S2, S2b, T, Tb – по 1,0 мл.

В пробирки прибавляют следующее количество стандартной суспензии Б: S1 и S1b – по 1,0 мл; S2 и S2b – по 2,0 мл; S3 и S3b – по 3,0 мл.

В пробирки T и Tb прибавляют по 2,0 мл испытуемой суспензии Б.

В пробирки B, S1b, S2b, S3b, Tb прибавляют по 5,0 мл раствора трихлоруксусной кислоты 5 % и встряхивают.

Пробирки и раствор казеина выдерживают в течение 10 мин в водяной бане при температуре 35±0,2 °С. В пробирки B, S1b, S2b, S3b, Tb прибавляют по 2,0 мл раствора казеина и встряхивают. В нулевой момент времени последовательно прибавляют по 2 мл раствора казеина в пробирки S1, S2, S3, T с интервалами в 30 сек, сразу же перемешивая.

Ровно через 30 мин (с учетом интервалов по 30 с) после прибавления раствора казеина в пробирки S1, S2, S3, T прибавляют по 5,0 мл раствора трихлоруксусной кислоты 5 % и тщательно перемешивают.

Вынимают пробирки из водяной бани и выдерживают их при комнатной температуре в течение 20 мин. Содержимое каждой пробирки фильтруют дважды через один и тот же бумажный фильтр, предварительно промытый раствором трихлоруксусной кислоты 5 %, затем водой, и высушенный.

Измеряют оптическую плотность фильтратов при длине волны 275 нм в кювете с толщиной слоя 1 см. В качестве раствора сравнения используют фильтрат раствора из пробирки B.

Рассчитывают средние величины оптической плотности фильтратов, полученных в пробирках S1, S2, S3, затем корректируют их, вычитая из них средние значений оптической плотности фильтратов, полученных в пробирках S1b, S2b, S3b соответственно.

Скорректированные величины оптической плотности должны находиться в границах допустимых интервалов от 0,15 до 0,60.

Строят градуировочный график, по оси ординат которой откладывают скорректированные значения оптической плотности, а по оси абсцисс – используемый объём стандартной суспензии Б (S1, S2, S3).

Активность испытуемой субстанции, соответствующую объёму стандартной суспензии, определяют по градуировочному графику на основании скорректированных значений оптической плотности фильтратов в пробирках с испытуемой суспензией T и Tb, учитывая коэффициент разведения.

Протеолитическую активность в ЕД/мг (AP) вычисляют по формуле:



|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *V* | − | скорректированный объём испытуемой пробы, мл; |
|  | *V1* | – | количество холодного раствора, эквивалентное от 7,0 до 8,0 ЕД, используемого для приготовления испытуемой суспензии, мл; |
|  | *a1* | − | навеска испытуемой субстанции, мг; |
|  | *a0* | – | навеска стандартного образца панкреатина, мг; |
|  | *Ac* | − | протеолитическая активность стандартного образца панкреатина, ЕД/мг. |

Хранение. В сухом, защищённом от света месте.