**Тимуса экстракт, ФС**

**лиофилизат для приготовления раствора**

**для внутримышечного введения Вводится впервые**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на лекарственный препарат тимуса экстракт, лиофилизат для приготовления раствора для внутримышечного введения. Активным компонентом препарата является тимуса экстракт 10 мг.

В состав препарата входят вспомогательные вещества.

ИСПЫТАНИЯ

**Описание.** Лиофилизированная аморфная масса в виде таблетки или порошка, белого или белого с желтоватым оттенком цвета.

**Растворимость.** Растворим в воде, 0,9 % изотоническом растворе натрия хлорида.

**Подлинность.**

*Пептиды:*

*1. Качественная реакция с биуретовым реактивом.* Раствор окрашивается в слабо-фиолетовый цвет.

*2. Спектрофотометрический.* Ультрафиолетовый спектр испытуемого раствора в области длин волн от 250 до 290 нм должен иметь максимум поглощения при длине волны 257-263 нм.

*3. Биологический* по разделу «Биологическая активность».

*Глицин.* На хроматограмме испытуемого раствора должно присутствовать пятно зеленого цвета, по положению, интенсивности окрашивания и величине соответствующее пятну глицина на хроматограмме раствора стандартного образца (СО). Определение проводят методом тонкослойной хроматографии в соответствии с ОФС «Тонкослойная хроматография».

**Прозрачность.** 0,01 % раствор субстанции в 0,9 % изотоническом растворе натрия хлорида должен быть прозрачным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей».

**Цветность.** Окраска 0,01 % раствора субстанции в 0,9 % изотоническом растворе натрия хлорида должен быть бесцветным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей».

**Однородность массы.** Для испытаний используют 20 флаконов. 18 флаконов из 20 могут иметь отклонения не более ± 10 %. У 2 флаконов из 20 допускается отклонение от средней массы на величину не более ± 20%. Определение проводят в соответствии с ОФС «Однородность массы дозированных лекарственных форм».

**рН.** От 5,2 до 6,0. Испытание проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

**Механические включения** Должен соответствовать требованиям ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах» и ОФС «Невидимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

**Родственные примеси.** Раствор должен оставаться прозрачным, определяют с помощью качественной реакции с трихлоруксусной кислотой. К 1 мл 0,01 % раствора субстанции в 0,9 % изотоническом растворе натрия хлорида прибавляют 1 мл 10 % раствора кислоты трихлоруксусной.

**Потеря в массе при высушивании.** Не более 10 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании».

**Пирогенность.** Должна быть апирогенной. Определение проводят в соответствии с ОФС **«Пирогенность».**

**Аномальная токсичность.** Должна быть нетоксична. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность».

**Стерильность.** Должна быть стерильной. Испытание проводят в соответствии с требованиями ОФС «Стерильность» методом прямого посева или мембранной фильтрации.

**Количественное определение**

*Пептиды.* Не менее 5 мг в 1 флаконе. Определение проводят спектрофотометрическим методом в соответствии с ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях».

*Глицин.* От 10 до 30 г в 1 флаконе. Определение проводят спектрофотометрическим методом в соответствии с ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях».

**Биологическая активность.** Восстановление розеткообразующих клеток (РОК) должно быть не менее 40 %.Определение проводят биологическим методом.

В опыт берут последовательно 5 морских свинок-самцов с массой тела 150 - 250 г., у животного удаляют тимус под наркозом. Одну долю тимуса помещают в 5 мл среды 199, далее в стеклянный гомогенизатор, тщательно гомогенизируют. Затем гомогенат фильтруют в центрифужную пробирку, через 4 слоя марли, предварительно смоченной средой 199. Пробирку с суспензией клеток центрифугируют при 1500 об/мин в течение 10 мин. Надосадочную жидкость удаляют и к осадку клеток прибавляют 1 мл среды 199, суспензируют.

В сухую центрифужную пробирку вносят 0,33 мл 3 % раствора кислоты уксусной и 0,02 мл взвеси тимоцитов, тщательно перемешивают. В камере Горяева подсчитывают количество клеток в 100 больших квадратах, полученное число умножают на 5104 и получают количество клеток в 1 мл. Если количество клеток в 1 мл окажется менее 100106, животное исключают из опыта и заменяют другим. Полученную суспензию клеток разбавляют средой 199 до концентрации 20106 клеток/мл. Одновременно готовят концентрацию суспензии 2 106 клеток/мл (норма).

В сухую центрифужную пробирку вносят в соотношении 6:1 суспензию тимоцитов в концентрации 20106 клеток/мл и 0,5 % раствор трипсина в среде 199, приготовленный непосредственно перед использованием. После прибавления раствора трипсина образовавшийся сгусток удаляют отсасыванием пипеткой. Суспензию клеток центрифугируют при 1500 об/мин (400 g) в течение 10 мин. Надосадочную жидкость аккуратно сливают, прибавляют 3 мл среды 199, тщательно ресуспендируют. Затем отмывают тимоциты от трипсина в этом же режиме. К осадку прибавляют 1 мл среды 199, тщательно ресуспендируют. Затем готовят рабочую суспензию с концентрацией 2 106 клеток/мл (контроль), как указано ранее.

Определение биологической активности препарата с использованием тимоцитов от одной морской свинки проводят следующим образом. В первую центрифужную пробирку вносят 0,1 мл контрольной суспензии тимоцитов в концентрации 2 106 клеток/мл (норма), во вторую (контроль) и третью (опыт) центрифужные пробирки вносят по 0,1 мл рабочей суспензии тимоцитов, обработанных трипсином, в той же концентрации. В третью пробирку прибавляют 0,02 мл 0,01 % раствора препарата в среде 199, приготовленного перед опытом. Затем во все пробирки прибавляют по 0,1 мл 1 % суспензии свежих отмытых раствором натрия хлорида изотонического 0,9 % эритроцитов кролика, разведенных в среде 199. Взвесь клеток перемешивают и центрифугируют в течение 5 мин при 800 - 1000 об/мин. Клетки ресуспендируют и в камере Горяева подсчитывают процентное содержание РОК в каждой из трех пробирок. За РОК принимают тимоцит, присоединивший 3 и более эритроцитов. В случае определения числа РОК в тимусе в норме (без обработки трипсином) менее 40 % или процентного содержания РОК в опыте менее, чем в контроле, животное исключают из опыта и заменяют другим. Определяют средние арифметические показатели процентного содержания РОК у 5 животных.

**Хранение.** При температуре не выше 20°С, в сухом защищенном от света месте. В соответствии с ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».