|  |
| --- |
|  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Гиалуронидаза** |  | **ФС** |
| **Гиалуронидаза** |  |  |
| **Hyaluronidasum** |  | **Вводится впервые** |

|  |
| --- |
|  |

Субстанция представляет собой фермент, получаемый из семенников млекопитающих (например, бычьих) и способный гидролизовать кислые мукополисахариды.

Гиалуронидазная активность должна быть не менее 300 МЕ/мг в пересчете на сухое вещество.

**Описание.** Белый или почти белый аморфный порошок.

**Растворимость.** Растворим в воде, практически нерастворим в спирте 96 % и ацетоне.

**Подлинность.***Ферментативная активность.*Раствор субстанции в натрия хлорида растворе 0,9 % с удельной активностью около 100 МЕ/мл гидролизует равный объём 1 % раствора стандартного образца натрия гиалуроната в течение 1 мин при температуре 20 °С; вязкость должна уменьшиться (ОФС «Вязкость»). При предварительной инактивации гиалуронидазы нагреванием при 100 °С в течение 30 мин вязкость остается неизменной.

**Прозрачность раствора.** Опалесценция 1 % раствора субстанции не должна превышать эталон сравнения II (ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей»).

**Цветность раствора.** Раствор, полученный в испытании «Прозрачность раствора», должен выдерживать сравнение с эталоном Y4 (ОФС «Степень окраски жидкостей», метод 2).

**pH.** От 4,5 до 7,5 (0,3 % раствор субстанции в воде, свободной от углерода диоксида, ОФС «Ионометрия», метод 3).

**Потеря в массе при высушивании.** Не более 5,0 % (ОФС «Потеря в массе при высушивании», способ 3). Около 0,5 г (точная навеска) субстанции высушивают при температуре 60 °С и остаточном давлении не более 670 Па в течение 2 ч.

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

**Бактериальные эндотоксины**. Не более 0,06 ЕЭ на 1 МЕ (ОФС «Бактериальные эндотоксины»).

**Аномальная токсичность.** Субстанция должна быть нетоксичной (ОФС «Аномальная токсичность»). Тест-доза – 3000 МЕ субстанции в 0,5 мл 0,9 % раствора натрия хлорида на мышь, внутривенно. Срок наблюдения 48 ч.

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

**Количественное определение**. Определение проводят методом вискозиметрии (ОФС «Вязкость»).

Метод основан на сравнении скорости гидролиза натрия гиалуроната, определяемой как линейная зависимость кинематической вязкости от времени реакции, субстанцией и стандартным образцом гиалуронидазы.

*Растворитель.* При перемешивании и нагревании растворяют 0,14 г желатина гидролизованного в 20 мл воды, переносят в мерную колбу вместимостью 200 мл, прибавляют 100 мл фосфатного буферного раствора рН 6,4 (1) и доводят объём раствора водой до метки. Срок годности - 2 ч.

Примечание. Испытуемый раствор и раствор стандартного образца гиалуронидазы готовят при температуре от 0 до 4 °С непосредственно перед использованием.

*Испытуемый раствор.* Готовят раствор субстанции в растворителе с концентрацией около 0,6±0,3 МЕ/мл.

*Стандартный раствор.* Готовят раствор стандартного образца гиалуронидазы в растворителе с концентрацией около 0,6 МЕ/мл.

*Раствор субстрата.* В коническую колбу вместимостью 25 мл помещают 0,10 г стандартного образца натрия гиалуроната, медленно прибавляют 20,0 мл воды при температуре 4 °С, позволяя веществу набухнуть (около 5 мин). Полученный раствор перемешивают при температуре 4 °С в течение 12 ч. Хранят при температуре 4 °С в течение не более 4 сут.

*Проведение анализа*

Определение гиалуронидазной активностисубстанции проводят по следующей схеме (время отмеряют точно по секундомеру):

|  |  |
| --- | --- |
|  | Пробирка |
| Опытная проба | Контрольная проба |
| Фосфатный буферный раствор рН 6,4 (1) | 1,5 мл |
| Раствор субстрата | 1,0 мл |
| Устанавливают постоянную температуру 37,0±0,5 °С. |
| Испытуемый раствор | 0,50 мл | – |
| Стандартный раствор | – | 0,50 мл |
| По прибавлению сразу замеряют время (*t1*), встряхивают, измеряют плотность на подходящем вискозиметре, термостатируемом при температуре 37,0±0,5 °С, и замеряют время истечения (*t2*). Повторяют измерение несколько раз в течение 20 мин (по *t1* ). |

Относительную вязкость (*ɳr*) для каждого измерения испытуемого и стандартного раствора вычисляют по формуле:

$$η\_{r}=\frac{K∙t\_{2}}{0,6915}$$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *K* | – | константа вискозиметра, мм2∙с-2; |
|  | *t2* | – | время истечения, с; |
|  | *0,6915* | – | кинематическая вязкость фосфатного буферного раствора рН 6,4 (1) при 37 °C, мм2∙с-1. |

Поскольку реакция гидролиза продолжается во время измерения плотности, фактическое время реакции равно *t1*+(*t2*/2).

Строят график, откладывая по оси ординат (ln(*ɳr*))-1, а по оси абсцисс − время реакции (*t1*+(*t2*/2)). По полученным графикам определяют тангенсы угла наклона прямой испытуемого (*bt*) и стандартного растворов (*br*).

Коэффициент корреляции прямых испытуемого и стандартного растворов должен быть не менее 0,95.

Гиалуронидазную активность в МЕ/мг (*Аh*) вычисляют по формуле:

$$A\_{h}=\frac{b\_{t}∙a\_{0}∙A\_{0}}{b\_{r}∙a\_{1}}$$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *bt* | – | тангенс угла прямой стандартного раствора; |
|  | *br* | – | тангенс угла прямой испытуемого раствора;  |
|  | *a1* | − | содержание субстанции в опытной пробе испытуемого раствора, мг; |
|  | *a0* | – | содержание гиалуронидазы в контрольной пробе стандартного раствора, мг; |
|  | *A0* | – | активность стандартного образца гиалуронидазы, МЕ/мг. |

Испытание проводят не менее трех раз и рассчитывают среднюю активность субстанции.

**Хранение.** В сухом защищённом от света месте при температуре от 2 до 8 °C.