**Рибонуклеаза лиофилизат ФС**

**для приготовления раствора**

**для парентерального и**

**местного применения Вводится впервые**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на лекарственный препарат рибонуклеазу лиофилизат для приготовления раствора для парентерального и местного применения 10 мг.

Препарат относится к гидролитическим ферментам. Рибонуклеаза обладает специфической способностью деполимеризовать РНК до кислоторастворимых моно- и олигонуклеотидов.

ПРОИЗВОДСТВО

Настоящая фармакопейная статья распространяется на Рибонуклеазу, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций и местного применения 10 мг, применяемую в качестве лекарственного препарата.

Ферментный препарат, выделяемый из поджелудочной железы крупного рогатого скота. Сырье получают из хозяйств от животных, у которых отсутствуют заболевания вирусной, прионовой, бактериальной и микоплазменной этиологии, патогенные для человека.

Все этапы процесса производства должны быть валидированы, и должны гарантировать качество и безопасность ее использования.

ИСПЫТАНИЯ

**Описание.** Лиофилизированная масса в виде таблетки, комочков, порошка или пластинок, белого или белого со слабым желтоватым оттенком цвета.

**Растворимость. Л**егко растворим в воде и 0,9 % растворе натрия хлорида; растворим в 0,5 % растворе новокаина. Определение проводят в соответствии с ОФС «Растворимость».

**Время растворения.** Не более 1 мин по секундомеру. Определение проводится в соответствии с ОФС «Растворимость»

**Подлинность.** Рибонуклеаза обладает специфической способностью деполимеризировать рибонуклеиновую кислоту. Определение проводят по разделу «Количественное определение».

**Однородность массы.** Каждый флакон должен содержать 10 мг ± 10% препарата. Определение проводят в соответствии с ОФС «Однородность массы дозированных лекарственных форм».

**Прозрачность.** Раствор 0,01 г препаратав 5 мл воды должен выдерживатьсравнение с эталоном № II. Определение проводят в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей».

**Цветность.** Раствор 0,01 г препаратав 5 мл воды должен выдерживать сравнение с эталоном ВY5. Определение проводят в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей».

**рН.** От 3,5 до 4,5 (0,2 % раствор). Испытание проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

# Механические включения. Должен выдерживать требования, указанные в ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

# Соли аммония. Не более 0,0002 %. Раствор 0,01 г препарата в 5 мл воды должен выдерживать испытание на соли аммония в соответствии с ОФС «Общие реакции на подлинность».

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

# Пирогенность. Должен быть апирогенным. Тест-доза 3 мг в 5 мл раствора натрия хлорида 0,9 % на 1 кг массы кролика. Испытуемое лекарственное средство, подогретое до температуры 37 °С, вводят в ушную вену в течение 2 мин. Определение проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность».

**Стерильность.** Должен быть стерильным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Стерильность» методом прямого посева.

# Количественное определение (ферментативная активность). От 80000 до 140000 ЕА/фл. Определение проводят в соответствии ОФС «Определение активности ферментных препаратов». Метод основан на определении кислоторастворимых веществ (олигонуклеотидов), освобождаемых рибонуклеазой в результате гидролиза рибонуклеиновой кислоты (РНК) в стандартных условиях. За единицу активности РНК-азы (ЕА) принимают количество фермента, вызывающее при воздействии его на субстрат (РНК) в течение 30 мин при температуре 37 °С освобождение такого количества кислоторастворимых веществ (олигонуклеотидов), которое приводит к возрастанию оптической плотности при длине волны 260 нм на одну единицу. В контрольную и в 2 опытные пробирки вносят по 0,25 мл субстрата. Помещают пробирки в водяную баню при температуре при температуре 37±0,5 °С. Через 5 мин только в опытные пробирки прибавляют по 0,25 мл приготовленного раствора препарата. Все пробирки выдерживают при температуре 37±0,5 °С в течение 30 мин, после чего в каждую пробирку вносят по 2,5 мл охлажденного на льду раствора бария перхлората. В контрольную пробирку прибавляют 0,25 мл раствора препарата. Пробирки встряхивают и выдерживают в ледяной бане в течение 30 мин, образовавшиеся осадки отделяют центрифугированием в течение 10 мин при 6000 об/мин. Из надосадочного слоя отбирают по 0,5 мл раствора, прибавляют по 2,5 мл воды и измеряют оптическую плотность растворов на спектрофотометре при длине волны 260 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют контрольную пробу, содержащую 0,25 мл раствора препарата.

# Содержание единиц активности (ЕА) во флаконе препарата (АЕА) вычисляют по формуле:

# АЕА= ЕА,

# где, 260- разница величин оптических плотностей опытной и контрольной проб;

# 3 - объем пробы с осадителем, мл;

# 6 – разведение пробы с осадителем, взятой для определения оптической плотности, мл;

# 250, 50, 25 – разведение, мл;

# 5 – количество флаконов, взятых в опыт;

# 0,25; 5; 5 – объем раствора препарата, взятого на анализ, мл.

# Примечание

# Приготовление 0,1 М ацетатного буфера рН 6,2.

# а) 13,609 (точная навеска) натрия уксуснокислого 3-водного помещают в мерную колбу вместимостью 1 л, растворяют в набольшем количестве воды и доводят объем раствора до метки.

# б) 5,60 мл кислоты уксусной, уд. вес 1,064, помещают в мерную колбу вместимостью 1 л, разбавляют в набольшим количеством воды и доводят объем раствора до метки. Полученные растворы смешивают в соотношении:

# раствор «а» 32 ч

# раствор «б» 1 ч

# рН буфера определяют потенциометрически.

# Раствор годен 30 дней.

# Приготовление раствора препарата. Содержимое 5 флаконов количественно переносят в мерную колбу вместимостью 250 мл, доводят объем раствора водой до метки, затем 5 мл этого раствора помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят объем раствора 0,1 М ацетатным буфером рН 6,2 до метки. Раствор используют свежеприготовленным.

# Приготовление раствора субстрата. 100 мг стандартного образа РНК (натриевая соль высокополимерной РНК растворяют в 10 мл 0,1 М ацетатного буфера рН 6,2 (1 % раствор) при встряхивании в течение 30 мин.

# Раствор используют свежеприготовленным.

# Приготовление раствора бария перхлората. 5 мл 83,5 % раствора бария перхлората Ba(ClO4)2 смешивают с 10 мл спирта изопропилового в мерной колбе вместимостью 100 мл и доводят объем раствора 95 % спиртом этиловым до метки. Раствор годен 30 дней.

# Общий белок. Содержание белка во флаконе должно быть в пределах от 8 до 11 мг. Определение проводят в соответствии ОФС «Определение белка».

# *Методика*

# Содержимое 5 флаконов количественно переносят в мерную колбу вместимостью 250 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Оптическую плотность испытуемого раствора измеряют на спектрофотометре при длине волны 280 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют воду.

# Калибровочный график строят, откладывая на оси абсцисс концентрацию рибонуклеазы в мг/мл а по оси ординат оптическую плотность.

# Количество белка (Х) во флаконе в миллиграммах вычисляют по формуле:

# Х=

# где, а – концентрация белка, найденная по калибровочному графику, мг/мл;

# 250 - разведение испытуемого образца, мл;

# 5 – количество флаконов, взятых для анализа

# Примечание

# Приготовление стандартного раствора рибонуклеазы 0,5 мг/мл. 25 мг рибонуклеазы помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 10 мл воды и доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают.

# Калибровочные (стандартные растворы) рибонуклеазы готовят в соответствии с таблицей.

# Таблица. Приготовление стандартных растворов рибонуклеазы для построения калибровочного графика

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| № п/п | Стандартный раствор рибонуклеазы, мл | Вода, мл | Концентрация рибонуклеазы, мг/мл |
| 1. | 1,00 | 9,00 | 0,05 |
| 2. | 2,00 | 8,00 | 0,10 |
| 3. | 3,00 | 7,00 | 0,15 |
| 4. | 4,00 | 6,00 | 0,20 |
| 5. | 5,00 | 5,00 | 0,25 |
| 6. | 6,00 | 4,00 | 0,30 |
| 7. | 7,00 | 3,00 | 0,35 |
| 8. | 8,00 | 2,00 | 0,40 |
| 9. | 9,00 | 1,00 | 0,45 |
| 10. | 10,00 | - | 0,50 |

# Калибровочный график строят при каждом определении.

# Удельная активность (расчетная величина). От 7000 до 14000 ЕА на 1 мг белка. Удельную активность (УА) препарата вычисляют по формуле:

# УА=

# где, А – активность во флаконе, ЕА;

# Х – содержание белка во флаконе, мг.

**Упаковка и маркировка.** В соответствии с ОФС «Лекарственные формы», ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

# Транспортирование и хранение. В сухом, защищенном от света месте при температуре не выше 25 °С. В соответствии с ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».