**Рибонуклеаза, ФС**

**субстанция Взамен ФС 42-2673-98**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на рибонуклеазу субстанцию ферментный препарат, получаемый из поджелудочной железы крупного рогатого скота.

Рибонуклеаза обладает специфической способностью деполимеризовать РНК до кислоторастворимых моно- и олигонуклеотидов.

Субстанция предназначена для производства готовых лекарственных препаратов.

ПРОИЗВОДСТВО

Субстанцию рибонуклеазы получают по непрерывной технологии 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.

Производство рибонуклеазы, полученной из поджелудочной железы крупного рогатого скота основано на том, что измельченную железу подвергают автолизу, затем проводят экстракцию с последующим высаливанием фермента различными концентрациями аммония сульфата. Из фильтрата осаждают РНКазу высаливанием аммония сульфатом до степени насыщения 0,8. Полученную аморфную РНКазу, отстаивают в течение 40—48 ч, сифонируют, а осадок отделяют фильтрованием или центрифугированием. Далее проводят очистку РНКазы, путем многократно повторяющихся операций (осаждение и растворение).

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

Субстанция должна производиться в соответствии с требованиями [правил надлежащей производственной практики](http://docs.cntd.ru/document/499029882), контроля качества биологических лекарственных препаратов и в соответствии с ОФС «Биологические лекарственные препараты» и ОФС «Фармацевтические субстанции».

 ИСПЫТАНИЯ

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

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

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

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

**Цветность.** Должна выдерживатьсравнение с эталономВY5. Определение проводят в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей».

Предварительно 0,01 г субстанциирастворяютв 5 мл воды.

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

**Соли аммония**. Не более 0,0002 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Общие реакции на подлинность».Предварительно 0,01 г субстанциирастворяютв 5 мл воды.

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

# Пирогенность. Должна быть апирогенной. Тест-доза 3 мг в 5 мл 0,9 % раствора натрия хлорида для инъекций на 1 кг веса кролика. Испытуемое лекарственное средство вводят в ушную вену в течение 2 мин. Определение проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность» для субстанции, предназначенной для приготовления инъекционных лекарственных форм.

# Аномальная токсичность. Должна быть нетоксичной. Тест-доза 4 мг в 0,5 мл 0,9 % раствора натрия хлорида для инъекций. Срок наблюдения 48 ч. Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность».

**Микробиологическая чистота.** Должна выдерживать требования по категории 1.2.Б (табл. 2) для производства стерильных лекарственных препаратов. Должна выдерживать требования по категории 3.2 (табл. 2) для производства нестерильных лекарственных препаратов согласно ОФС «Микробиологическая чистота».

# Количественное определение. Ферментативная активность должна быть от 8000 до 14000 ЕА/мг, в соответствии ОФС «Определение активности ферментных препаратов».

# Методика

# Методика основана 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 2 опытные пробирки вносят по 0,25 мл приготовленного раствора субстанции. 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 хлорнокислого. В контрольную пробирку прибавляют 0,25 мл раствора субстанции. 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 в 10 мм. В качестве раствора сравнения используют контрольную пробу.

# Содержание единиц активности (ЕА) в 1 мг субстанции (Х) вычисляют по формуле:

# Х=$\frac{∆Д\_{260} ∙500∙25∙3∙3}{а∙5∙0,5∙0,25}$ = $\frac{∆Д\_{260} ∙180000}{а}$ (ЕА)

# где:

#  $∆Д\_{260}$ - разница величин оптических плотностей опытной и контрольной проб;

# а – навеска рибонуклеазы, мг;

# 500, 25, 3, 3 – объем проб при разведении, мл;

# 5 - объем раствора препарата, взятого на разведения, мл;

# 0,25 – объем раствора рибонуклеазы, взятого в опыт, мл;

# 0,5 – объем реакционной смеси, отобранной для измерения оптической плотности, мл.

# Примечание

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

# а) 13,61 (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 хранят при температуре от 2 до 8 º С в течение 30 дней.

# Приготовление раствора субстанции рибонуклеазы. Около 10 мг субстанции (точная навеска), растворяют в 100 мл воды в мерной колбе вместимостью 500 мл, доводят объем раствора до метки и перемешивают. 5 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора 0,1 М ацетатным буфером рН 6,2 (1 % раствор) до метки и перемешивают, 1 мл раствора содержит около 0,004 мг рибонуклеазы. Раствор готовят непосредственно перед использованием.

# 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 готовят непосредственно перед использованием.

#  Приготовление раствора бария хлорнокислого. 5 мл 83,5 % раствора бария хлорнокислого 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 хранят при температуре от 2 до 8 º С в течение 30 дней.

**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 20 °С в соответствии с ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств». Допускается временное повышение температуры до 25 оС до двух мес.