**Гемицеллюлаза ФС**

 **Вводится впервые**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на субстанцию (полуфабрикат) гемицеллюлазы. Субстанция представляет собой ферментный комплекс *Trichoderma reesei*, обладающий способностью гидролизовать гемицеллюлозу (некрахмалистый полисахарид клеточных стенок растений). В состав субстанции входят также вспомогательные вещества.

Субстанция предназначена для производства готовых форм лекарственных препаратов, применяющихся для улучшения пищеварения (пищеварительные ферментные средства).

ПРОИЗВОДСТВО

Субстанцию гемицеллюлазы получают путем глубинного культивирования производственного штамма *T. reesei* на оптимальной питательной среде с последующим выделением из культуральной жидкости, очисткой и сушкой ферментного комплекса в присутствии наполнителя (лактозы или другого подходящего).

Производственные штаммы. Для производства субстанции используют *T. reesei* или другие штаммы грибов - продуцентов гемицеллюлазы. Штаммы продуцентов должны быть депонированы в национальных или международных коллекциях.

Контроль качества производственных штаммов должен проводиться не реже одного раза в год, если в нормативной документации нет других указаний.

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

ИСПЫТАНИЯ

**Описание.** Аморфный порошок от желтовато-белого до серовато-белого цвета с характерным запахом. Гигроскопичен, слегка слёживается при хранении. Определение проводят органолептическим методом.

**Подлинность.** Подтверждается снижением вязкости раствора натрия карбоксиметилцеллюлозы (геми­целлюлаза, раздел «Количественное определение») и качественной реакцией на лактозу (красно-оранжевое окрашивание при нагревании препарата в присутствии раствора аммиака).

**Растворимость.** Растворим (медленно) в воде с образованием слегка опалесцирующего раствора, практически не растворим в спирте 96 %. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Растворимость».

**Потеря в массе при высушивании**. Не более 5,0 % (ОФС «Потеря в массе при высушивании»). Около 1 г (точная навеска) субстанции сушат при 100 - 105 °С в течение 1 ч.

**рН.** От 3,5 до 5,5. Субстанцию в количестве 0,4 г растворяют при постоян­ном перемешивании и нагревании (не выше 30 °С) в 25 мл воды, свободной от углерода диоксида. Охлаж­дают и измеряют pH потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

**Сульфатная зола.** Не более 1,5 % в пересчете на сухое вещество. Определение проводят в соответствии с ОФС «Сульфатная зола», используя около 1 г (точная навеска) субстанции.

# Тяжелые металлы. Не более 50 ppm (0,005 %). Определение проводят в соответствии с ОФС «Тяжелые металлы» (метод 2).

# *Матричный раствор свинца нитрата* *(1000 ppm свинец-иона).* 0,4 г свинца нитрата помещают в мерную колбу вместимостью 250 мл, растворяют в воде очищенной и доводят объём раствора водой до метки.

# *Стандартный раствор свинца (10 ppm свинец-иона).* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 1 мл матричного раствора свинца нитрата и добавляют воду очищенную до метки.

# *Тиоацетамидный реактив.* Смешивают 15 мл 1 М раствора натрия гидроксида, 5 мл воды очищенной и 20 мл глицерола раствора 85 %. Отбирают 1 мл полученного раствора, добав­ляют к нему 0,2 мл тиоацетамида раствора 4 % и нагревают на кипящей водяной бане в течение 20 сек. Приготовленный реактив охлаждают и используют незамедлительно.

# *Испытуемый раствор.* В кварцевый тигель, содержащий 4 мл магния сульфата раствора 250 г/л в серной кислоте разведенной 9,8 %, помещают 0,5 г (точная навеска) испытуемого образца, перемешивают, затем жидкость выпаривают на кипящей водяной бане. Остаток озоляют на открытом огне и прокаливают при температуре не выше 800 °С до получения остатка почти белого или сероватого цвета, который охлаждают и смачи­вают несколькими каплями серной кислоты разведенной 9,8 %, после чего жидкость выпаривают на открытом пламени и остаток снова прокаливают. Суммарное время прокаливания не должно превышать 2 ч. Остаток из тигля количественно переносят в пробирку двумя порциями хлористоводородной кислоты разведенной 7,3 %, по 5 мл каждая, добавляют 0,1 мл фенолфталеина раствора 0,1 %, и нейтрализуют аммиака раствором концентрированным 25 % до появления розового окрашивания. Смесь охлаждают, добавляют уксусную кислоту ледяную до обесцвечивания раствора и прибавляют еще 0,5 мл уксусной кислоты ледяной. При необходимости фильтруют и промывают фильтр. Доводят объем раствора водой очищенной до 20 мл.

# *Стандартный раствор.* Готовят так же, как испытуемый раствор, используя вместо исследуемого вещества 2,5 мл стандартного раствора свинца (10 ppm свинец-иона). К 10 мл полученного раствора добавляют 2 мл испытуемого раствора.

# *Раствор сравнения.* Готовят так же, как испытуемый раствор, прибавляя к исследуемому веществу (0,5 г препарата) 2,5 мл стандартного раствора свинца (10 ppm свинец-иона). К 10 мл полученного раствора добавляют 2 мл испытуемого раствора.

# *Холостой раствор.* Смешивают 2 мл испытуемого раствора и 10 мл воды очищенной.

# *Проведение анализа*

# В отдельные одинаковые пробирки из бесцветного стекла помещают 12 мл испытуемого раствора, 12 мл стандартного раствора, 12 мл раствора сравне­ния и 12 мл холостого раствора. В каждую пробирку добавляют по 2 мл бу­ферного раствора (рН 3,5) и по 1,2 млтиоацетамидного реактива. Через 2 мин сравнивают окраску растворов визуально (вертикально по оси пробирки в проходящем свете на белом фоне).

# *Оценка результатов*

# Окраска испытуемого раствора по интенсивности не должна быть более ин­тенсивной, чем окраска стандартного раствора.

# Результаты испытания считаются не действительными, если стандартный раствор не приобретает слабо коричневого окрашивания в сравнении с холо­стым раствором или если невозможно провести сравнение окраски стандарт­ного раствора и раствора сравнения*.*

# При затруднении с оценкой результатов, растворы фильтруют через соответствующий мембранный фильтр и сравнивают пятна на фильтрах.

**Аномальная токсичность**. Должен быть нетоксичным (ОФС «Аномальная токсичность»). Субстанцию вводят внутрижелудочно по 10 мг препарата в 0,5 мл воды для инъекций на мышь. Срок наблюдения составляет 48 ч.

**Микробиологическая чистота.** Определение проводят в соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота» (категория 3.2. табл.2).

**Количественное определение.** Ферментативная активность субстанции гемицеллюлазы должна быть от 530 до 2670 Ед./г. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Определение активности ферментных лекарственных препаратов».

За единицу активности (Ед.) гемицеллюлазы принимают количество фермента, которое при определенных условиях расщепляет натрия карбоксиметилцеллюлозу со скоростью, обеспечивающей снижение вязкости раствора субстрата на 1 мПа·с за 1 мин при pH 7,6 и 20 °C.

Активность субстанции определяют только в смеси с лактозой в соотношении от 1:10 до 1:50 (определяют опытным путём для каждого об­разца).

 Определение проводят не менее чем на трех образцах тритурации с со­блюдением выше указанного диапазона значений и вычисляют среднее арифметическое значение количественного содержания (активности) и удельной активности гемицеллюлазы в субстанции.

*Фосфатный буферный раствор pH 7,6.* В мерную колбу вместимо­стью 1000 мл помещают 0,9 г натрия фосфата однозамещённого и 15,59 г на­трия фосфата двузамещённого, растворяют в 200 мл воды очищенной и доводят объём раствора водой до метки. При необходимости устанавливают pH 7,6 ± 0,1 (потенциометрически) с помощью натрия гидро­ксида раствора 30 % или фосфорной кислоты концентрированной. Срок годности раствора 1 мес.

*Натрия карбоксиметилцеллюлозы раствор.* В подходящий химиче­ский стакан вместимостью 250 мл помещают 100 мл фосфатного буферного раствора (рН 7,6), взвешивают 2 г натрия карбоксиметилцеллюлозы и рассыпают по поверхности водного зер­кала. Оставляют набухать в течение 1 ч, затем растворяют при постоянном перемешивании до получения прозрачного вязкого раствора. Рас­твор помещают в термостат (20 ± 0,2 °C) и выдерживают в течение 2 ч при периодическом (каждые 15 мин) перемешивании. Измеряют вязкость полученного раствора. При необходимости вязкость полученного раствора доводят фосфатным буферным раствором (рН 7,6) до (240 ± 5) мПа·с. Раствор используют свежеприготовленным.

*Тритурация субстанции с лак­тозой.* Тритурацию препарата с лак­тозой готовят в соотношении 1:10. Если значение вязкости раствора после обработки препаратом будет меньше (80 ± 15) мПа·с, соотношение препарата и лактозы изменяют в пределах от 1:10 до 1:50.

Примерно третью часть (1/3) рассчитанного количества лактозы поме­щают в фарфоровую ступку и растирают в тонкий порошок. Добавляют препарат, перемешивают при растирании и в несколько приёмов прибавляют оставшееся количество лактозы. Растирают до получения однородного тон­кого порошка.

*Испытуемый раствор.* В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают около 125 мг (точная навеска) полученной тритурации субстанции с лактозой, растворяют в 15 мл фосфатного буферного раствора (рН 7,6) при нагревании (не выше 30° С) и переме­шивании, охлаждают, доводят объём тем же растворителем.

*Проведение анализа*

В широкий химический стакан вместимостью 200 мл (отношение высо­ты стакана к диаметру не более чем 2:1) помещают 100 мл раствора карбок- симетилцеллюлозы, добавляют 10 мл раствора тритурации субстанции в фосфатном буферном растворе (рН 7,6), перемешивают и выдерживают при (20 ± 0,2 °C) в течение 2 ч при периодическом пере­мешивании (каждые 15 мин).

Количественное содержание гемицеллюлазы в субстанции (*А,* Ед./г) рассчитывают по формуле:

$А=\frac{V ∙ T ∙ 50}{120 ∙ m ∙ 10} ,$ где

*V = Vo - Vi*

*Vo* - вязкость исходного раствора карбоксиметилцеллюлозы, мПа·с;

*Vi* - вязкость испытуемого раствора карбоксиметилцеллюлозы, мПа·с;

*Т* - тритурационное соотношение (количество лактозы в граммах, рассчитанное на 1 г препарата);

*m* - навеска тритурации препарата с лактозой, г;

120 - время проведения анализа, мин.

**Белок.** От 3 до 20 %. Определение белка проводят по содержанию общего азота микромето­дом Кьельдаля в соответствии с ОФС **«**Определение азота в органических соединениях методом Къельдаля» (метод 2 – микрометод Къельдаля).

**Удельная активность.** Удельная активность субстанции гемицеллюлазы должна быть не менее 2500 Ед./г белка.

Удельную активность субстанции (*Ар,* Ед./г белка) рассчитывают по формуле:

*Ар*$ =\frac{А }{Р} ,$где

*А* - активность гемицеллюлазы, Ед./г;

*Р* - содержание белка в препарате, %.

**Транспортирование и** **хранение.** При температуре не выше 15 °С в сухом месте в соответствии с ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств», ОФС «Хранение лекарственных средств» и ОФС «Биологические лекарственные препараты».

.