\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

**Простаты экстракт, ФС**

**субстанция – порошок Вводится впервые**

 Настоящая фармакопейная статья распространяется на простаты экстракт, субстанция - порошок. Действующим веществом субстанции является экстракт предстательной железы (водорастворимые пептиды) полученный из ткани простаты быков и бычков, достигших половой зрелости. Действующие вещества экстракта простаты относятся к группе пептидных биорегуляторов – цитомедины, представляющие собой пептиды с молекулярной массой от 1000 до 10000.

 Субстанцию получают из экстракта простаты, содержащую не менее 9 % водорастворимых пептидов, предназначенную для приготовления стерильных и нестерильных лекарственных форм.

 Сырье для производства экстракта простаты получают от хозяйств из регионов благополучных по особо опасным и карантинным болезням животных и заготавливается от животных крупного рогатого скота, достигшего половой зрелости, у которых отсутствует заболевания вирусной, прионовой, бактериальной и микоплазменной этиологии, патогенные для человека.

 В состав препарата входят вспомогательные вещества.

 ИСПЫТАНИЯ

 **Описание.** Кристаллический порошок от белого до светло-желтого или светло-коричневого цвета. Испытание проводят визуально.

 **Подлинность.** Проводят определение пептидов методом качественной реакции с биуретовым реактивом и методом УФ – спекрофотометрии, и глицина – методом тонкослойной хроматографии.

*Пептиды*

Реакция с биуретовым реактивом

 Методика

 К 1 мл испытуемого раствора и 1 мл воды (раствор сравнения) прибавляют по 4, 0 мл биуретового реактива и перемешивают. Испытуемый раствор окрашивается в фиолетовый цвет.

 Метод УФ – спекрофотометрии

 Методика

 К 1,0 мл испытуемого раствора прибавляют 9,0 мл воды. Измеряют оптическую площадь при длине волны от 250 нм до 350 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. Максимум поглощения испытуемого раствора должен быть при 270±5 нм. В качестве раствора сравнения используют воду.

 *Глицин*

 Метод тонкослойной хроматографии (ТСХ). На хроматограмме испытуемого раствора должно обнаруживаться пятно красно – фиолетового цвета на уровне пятна СО глицина. Определение проводят в соответствии с ОФС «Тонкослойная хроматография».

 Методика

 На линию старта на расстоянии 2 см от нижнего края пластины для ТСХ размером 10 Х 10 см, толщиной слоя 90 Х 120 мкм наносят полосой 5 мкл испытуемый раствор и 5 мкл раствора СО глицина. Пластину с нанесенными пробами сушат на воздухе в течение 5 – 10 мин или в токе теплого воздуха. Затем помещают в камеру, насыщенную смесью растворителей в соотношении 3:1:1: бутанол : уксусная кислота ледяная : вода и проводят хроматографирование восходящим способом. После того, как фронт растворителей пройдет расстояние 7 – 8 см, пластину вынимают из камеры и сушат на воздухе или в токе теплого воздуха. Далее хроматограмму опрыскивают раствором нингидрина в ацетоне и сушат в течение 10 мин при температуре 80 º С.

 Примечания

 Приготовление испытуемого раствора. К 1 мл раствора А, (приготовление раствора приведено в разделе «Количественное определение») прибавляют 10 мл воды и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

 Приготовление раствора СО глицина. 0,01 г глицина растворяют в 5 мл воды и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

 Приготовление раствора нингидрина в ацетоне. 0,85 г нингидрина помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в ацетоне, доводят объем раствора до метки тем же растворителем и перемешивают Раствор хранят в течение 30 сут во флаконе из темного стекла при температуре от 0 до 40 ºС.

**Растворимость.** Умеренно растворима в воде, 0,9 % растворе натрия хлорида, 0,25 – 0,5 % растворе прокаина и практически нерастворима в 96 % этаноле и хлороформе. Определение проводят в соответствии с ОФС «Растворимость».

 **Прозрачность**⨳**.** Недолжна превышать сравнение с эталоном I. Определение проводят в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей».

 Примечание

⨳Определение проводят в субстанции, предназначенной для приготовления стерильных лекарственных форм.

 **Цветность**⨳**.** Не должна превышать сравнения с эталоном Y4. Определение проводят в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей».

Примечание

⨳Определение проводят в субстанции, предназначенной для приготовления стерильных лекарственных форм.

 **Высокомолекулярные примеси (белок).** Испытуемый раствор должен выдерживать сравнение с эталоном II в соответствии с ОФС ««Прозрачность и степень мутности жидкостей». Испытания проводят с помощью качественной реакции с трихлоруксусной кислоты

.

 2,5 мл раствора А (приготовление раствора приведено в разделе «Количественное определение») помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. К 1 мл испытуемого раствора прибавляют 1 мл 10 % раствора трихлоруксусной кислоты и проводят наблюдения в течение 10 мин.

 Примечание

Приготовление 80 % раствора трихлоруксусной кислоты. 150 г трихлоруксусной кислоты растворяют в 100 мл воды. 1 мл полученного раствора титруют 1 М раствором натрия гидроксида (индикатор – фенолфталеин).

Концентрацию трихлоруксусной кислоты в процентах вычисляют по формуле: Х = а·0,1634·100 = а· 16,34;

где: а – количество 1 М раствора натрия гидроксида, пошедшее на титрование испытуемого раствора, мл;

 0,1634 – количество трихлоруксусной кислоты, соответствующее 1 мл 1 М раствора натрия гидроксида, г.

Полученный раствор разводят водой до концентрации 80 %. Раствор хранят в течение 3 мес в склянке из темного стекла при комнатной температуре.

Приготовление 10 % раствора трихлоруксусной кислоты. В мерный цилиндр, вместимостью 100 мл, помещают 10 мл 80 % раствора трихлоруксусной кислоты, прибавляют 70 мл воды и перемешивают. Раствор хранят в течение 1 мес в склянке из темного стекла при комнатной температуре.

 **Соли цинка.**  Испытуемый раствор не должен превышать по степени мутности эталонного раствора цинка-иона. Перед проведением испытания готовят испытуемый раствор: 1 мл раствора А, приготовленного по методике, указанной в разделе «Количественное определение» помещают в мерную колбу вместимостью 500 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Определение проводят в соответствии с ОФС «Цинк».

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

 **Остаточные органические растворители.** Должно быть не более 5 % уксусной кислоты. Определение проводят методом газожидкостной хроматографии в соответствии с ОФС «Газожидкостная хроматография».

 *Подготовка пробы*. 0,15 г (точная навеска) субстанции помещают в предварительно взвешенный флакон, добавляют 2 мл воды, перемешивают и добавляют 0,02 мл хлористоводородной кислоты концентрированной. Флакон закрывают крышкой, со вставленной в нее септой, обжимают кримпером и выдерживают в термостате автодозатора при температуре 95 ºС в течение 30 мин. Паровая фаза отбирается шприцем, нагретым до 95 ºС и автоматически вводится в испаритель хроматографа.

 *Приготовление градуировочных смесей* (*уксусная кислота – вода).* В стеклянные флаконы вместимостью 20 мл отбирают вычисленные навески уксусной кислоты и воды. Флакон закрывают пробкой и перемешивают его содержимое. Точную массовую долю каждого компонента определяют по разности массы флакона до и после прибавления компонента смеси. Результаты всех взвешиваний в граммах фиксируют с точностью до четвертого десятичного знака.

 Ориентировочный состав градуировочных смесей приведены в табл. 1.

 Таблица 1 – Ориентировочный состав градуировочных смесей в процентах.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Компонент | Смесь 1, % | Смесь 2, % | Смесь 3, % |
| Уксусная кислота |  0,10 |  5 |  15 |
| Вода |  99,9 |  95 |  85 |

 Массовую долю уксусной кислоты в смеси (*Хгр*) в процентах вычисляют по формуле:

 *Х гр* = $\frac{m1∙md}{m1+m2};$

 где: *m1 –* масса навески уксусной кислоты, г;

 m2 - масса навески воды; г;

 *md* - массовая доля основного вещества в уксусной кислоте, %.

 Предлагаемые х*роматографические условия*

 - Газовый хроматограф с пламенно-ионизационным детектором с пределом детектирования – не более 5·10-12Сr/с;

 - Хроматографическая капиллярная колонка – 30 м · 0,32 мм · 0,5 мкм или 50 м · 0,32 мм · 0,5 мкм. Допускается использование альтернативных колонок, удовлетворяющих требованиям пригодности хроматографической системы;

 - Масса пробы – 0,15 г;

 - Объем воды – 2 мл;

- Объем хлористоводородной

 кислоты концентрированной -0,02 мл;

- Температура термостатирования пробы – 95 ºС;

- Продолжительность термостатирования пробы – 30 мин;

- Объем вводимой пробы – 0,5 мл;

- Температура инжектора – 150 ºС;

- Температура детектора – 250 ºС;

- Газ-носитель – азот;

- Скорость движения потока по колонке – 0,78 мл/мин;

- Режим контроля потока – по линейной скорости;

- Линейная скорость – 19 см/сек;

- Коэффициент деления потока – 1:50;

- Температура термостата колонки – 150 ºС;

- Детектор: скорость подачи воздуха – 400 мл/мин;

 скорость подачи водорода -40 мл/мин;

- Время хроматографирования – 15 мин.

 Условия анализа могут быть изменены в соответствии с использованием различных марок и особенностей хроматографа.

 *Проверка пригодности хроматографической системы*

 Во флакон вместимостью 20 мл вносят 0,15 г градуировочной смеси, состоящей из 5 % раствора уксусной кислоты и 2 мл воды. Флакон закрывают крышкой со вставленной в нее септой, обжимают кримпером и выдерживают в термостате автодозатора при температуре 95 º С втечение 30 мин. Паровая фаза отбирается шприцом, нагретым до 95 º С и автоматически вводится в испаритель хроматографа. Из одного нагретого флакона отбор пробы паровой фазы проводят один раз. Последовательно хроматографируют 0,5 мл паровой фазы приготовленного раствора не менее 5 раз.

 Относительное стандартное отклонение площади пика уксусной кислоты не должно превышать 10 %. Эффективность колонки, рассчитанная по пику уксусной кислоты, должна быть не менее 3000 теоретических тарелок, коэффициент ассиметрии, рассчитанный по пику уксусной кислоты, должен быть не более 2.

 *Оценочный график*

 Для определения ориентировочной массовой доли уксусной кислоты в анализируемой пробе строят оценочный график зависимости площади пика уксусной кислоты на хроматограмме от массовой доли уксусной кислоты в градуировочной смеси.

 Анализ проводят аналогично методике изложенной в разделе «Проверка пригодности хроматографической системы». Указанную процедуру осуществляют три раза для каждой градуировочной смеси. Площадь пика уксусной кислоты на хроматограмме определяют с помощью системы обработки данных, усредняя полученные значения в каждой градуировочной смеси по всем параллельным определениям. График должен иметь вид прямой линии, проходящей через начало координат.

 Оценочный график строят заново после смены колонки, хроматографа.

 *Ход анализа*

 Проводят хроматографирование испытуемой пробы. По хроматограмме определяют площадь пика уксусной кислоты ( *S1*) и по оценочному графику находят ее ориентировочную массовую долю. Далее в зависимости от оринтировочной массовой доли определяют объем уксусной кислоты, который следует добавить в испытуемую пробу: 0,010 мл при 0,10 ≤ Х1 ˂1,0;

0,015 мл при 1,0 ≤ Х1 ˂ 15, где Х1 – массовая доля уксусной кислоты, найденная по оценочному графику, в процентах. Затем во взвешенный флакон с пробкой микрошприцем вносят необходимый объем уксусной кислоты и определяют ее массу. Испытуемую пробу с добавкой повторно термостатируют в течение 30 мин при температуре 95 º С, снова отбирают паровую фазу пробы с добавкой нагретым шприцем и вводят в хроматограф.

 На полученной хроматограмме находят площадь пика уксусной кислоты (S2).

 Вычисляют массовую долю уксусной кислоты (Х) в испытуемой пробе в процентах по формуле:

 Х = $\frac{(mдоб∙ md)}{m∙(\frac{S2}{S1}-1)};$

 где *: m*доб - масса добавленной уксусной кислоты,г;

 *md –* массовая доля основного вещества в уксусной

 кислоте, %;

 *m –*масса навески;

 *S –* площадь пика уксусной кислоты в исходной пробе;

 *S –* площадь пика уксусной кислоты в пробе с добавкой.

 За результат измерения массовой доли уксусной кислоты принимают среднее арифметическое значение (Х ср) результатов двух параллельных определений, расхождение между которыми не превышает 10 % по сходимости результатов анализа.

 **Сульфатная зола.** Не более 10 %. Сульфатная зола из 1 г субстанции должна выдерживать испытание на сульфатную золу. Определение проводят в соответствии с ОФС «Сульфатная зола».

 **Тяжелые металлы.** Не более 0,001 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Тяжелые металлы», раздел «Определение тяжелых металлов в растворах лекарственных средств».

**Пирогенность**⨳**.** Должна быть апирогенной. Определение проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность». Тест-доза 0.5 мг простаты экстракта в 1 мл 0,9 % раствора натрия хлорида для инъекций на 1 кг массы тела кролика.

Примечание

⨳Определение проводят в субстанции, предназначенной для приготовления стерильных лекарственных форм.

**Аномальная токсичность**⨳**.** Должна быть нетоксичной. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Тест – доза: 0,5 мг простаты экстракта в 0,5 мл 0,9 % раствора натрия хлорида для инъекций на мышь, внутримышечно. Срок наблюдения – 72 ч.

Примечание

⨳Определение проводят в субстанции, предназначенной для приготовления стерильных лекарственных форм.

 **Микробиологическая чистота**. Субстанция, предназначенная для приготовления стерильных лекарственных форм должна соответствовать требованиям категории 1.2.Б (табл. 2). Определение проводят в соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота».

 Субстанция, предназначенная для приготовления нестерильных лекарственных форм должна соответствовать требованиям категории 3.Б. Определение проводят в соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота».

 **Количественное определение.** Содержание водорастворимых пептидов должно быть не менее 9 %. Содержание глицина должно быть не менее 60 % и не более 90 %.

*Водорастворимые пептиды*

Определение проводят методом УФ -спектрофотометрии

Методика

Около 3 г (точная навеска) субстанции помещают в градуированный стеклянный стакан вместимостью 100 мл, прибавляют 60 мл воды и перемешивают в течение 30 мин на магнитной мешалке. Далее раствор фильтруют через бумажный фильтр марки «белая лента» (раствор А).

*Испытуемый раствор*. 0,5 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 200 мл, доводят объем раствора до метки 0,9 % раствором натрия хлорида и перемешивают. Измеряют оптическую плотность полученного раствора при двух длинах волн 215 и 225 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве контрольного раствора используют 0,9 % раствор натрия хлорида.

Содержание биологически активных веществ (Х) в ампуле в миллиграммах вычисляют по формуле:

 Х = $\frac{(А \_{215}- А\_{225})·60·200·0,000144·100}{а·0,5};$

где:

А 215, А 225- значения оптической плотности испытуемого раствора при длинах волн 212 и 225 нм;

а – навеска испытуемого раствора, г;

 0,000144 – экпериментальный коэффициент для белков при дифференциальном измерении поглощения растворов, г/мл;

 *Глицин*

 Определение проводят методом потенциометрического титрования.

 Около 0,3 г (точная навеска) субстанции растворяют в 6 мл муравьиной кислоты, прибавляют 100 мл уксусной кислоты ледяной и титруют потенциометрически 0,1 М раствором хлорной кислоты.

 1 мл 0,1 М раствора хлорной кислоты соответствует 0,007507 г глицина.

**Специфическая активность.** Должен быть не менее 13 % восстановления активности щелочной фосфатазы, ингибированной цистеином. Определение проводят методом УФ – спектрофотометрии.

 *Испытуемый раствор*. 0,150 г субстанции растворяют в 3 мл 0,1 М трис-буферного раствора с НСL рН 9,0±0,1.

 В шесть пробирок добавляют компоненты реакционной смеси (общий объем 3 мл) в последовательности и объемах указанных в табл. 2.

Таблица 2 – Состав реакционной смеси в пробирках 1- 6.

|  |  |
| --- | --- |
|  Исходные растворы | Количество и последовательность прибавляемых растворов, мл |
|  Номера пробирок |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| 0,1 М трис-буферный раствор с НСL рН 9,0±0,1 | 1,7 | 1,6 | 1,4 | 1,3 | 1,1 | 1,0 |
| 10 ммоль/л раствор магния хлорида | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 |
| 9 ммоль/л раствор натрия n-нитрофенилфосфат | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| 20 ммоль/л раствор цистеина |  - |  - | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 |
| Испытуемый раствор | - | - | - | - | 0,3 | 0,3 |
| Щелочная фосфатаза | - | 0,1 | - | 0,1 | - | 0,1 |

 Испытуемый раствор добавляют непосредственно перед добавлением фермента. Добавляют раствор щелочной фосфатазы и через 5 мин останавливают реакцию, прибавляя 1 мл 2 М раствора натрия гидроксида, содержащего 2мг/мл (этилендинитрил) тетрауксусную кислоту. Измеряют оптическую плотность испытуемого раствора при длине волны 405 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм против соответствующих контрольных растворов, не содержащих щелочную фосфатазу.

 Восстановление активности щелочной фосфатазы (Х) в процентах находят по формуле:

 Х= $\frac{(А\_{6-5}- А\_{4-3)}}{А\_{2-1} }$ ˑ100

 где:

 А6-5;А4-3;А2-1 – значение оптических плотностей растворов из пробирок 2, 4, 6 против соответствующих соответствующих контрольных растворов 1,3, 5.

 Примечания

 Приготовление 0,1 М трис-буферный раствор с НСL рН 9,0±0,1. 6,06 г трис помещают в мерную колбу вместимостью 500 мл, прибавляют 52 мл 0,1 М раствора хлористоводородной кислоты, растворяют в 400 мл воды, перемешивают, доводят объем раствора до метки и вновь перемешивают. Раствор хранят в течение 7 сут при температуре от 8 до 10 ºС.

 Приготовление 10 ммоль/л раствора магния хлорида. 203,3 мг магния хлорида 6 водного помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в воде, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Раствор хранят в течение 12 мес при температуре от 2 до 10 ºС.

 Приготовление 9 ммоль/л раствора натрия п-нитрофенилфосфатазы. 59,3 мг натрия п-нитрофенилфосфата помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 0,1 М трис-буферный растворе с НСL (рН 9.0±0,1), доводят объем раствора тем же буферным раствором до метки и перемешивают. Раствор должен быть свежеприготовленным.

 Приготовление раствора цистеина 20 ммоль/л. 60,5 мг цистеина помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 0,1 М трис-буферном растворе с НСL (рН 9.0±0,1), доводят объем раствора тем же буферным раствором до метки и перемешивают. Раствор должен быть свежеприготовленным.

 Приготовление раствора щелочной фосфатазы. 13 мг щелочной фосфатазы из кишок цыплят с активностью 0,4 ед/мг растворяют в 50 мл 0,1 М трис-буферном растворе с НСL (рН 9.0±0,1), доводят объем раствора тем же буферным раствором до метки и перемешивают. Раствор должен быть свежеприготовленным.

 Приготовление 2 М раствора натрия гидроксида, содержащего (этилендинитрил) тетрауксусная кислота концентрации 2 мг/мл. 8 г натрия гидроксида и 200 мг этилендиаминтетраацетата растворяют в воде в мерной колбе вместимостью 100 мл, доводят объем раствора до метки и перемешивают. Раствор хранят в полиэтиленовой таре в течение 1 мес при температуре от 8 до 10 ºС.

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

 Транспортирование и хранение. В защищенном от света месте при температуре от 2 до 15 ºС в соответствии с ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственны средств».