|  |  |
| --- | --- |
| **Найя найя****Найя трипудианс** **Naja naja****Naja tripudians** | ФС**Вводится впервые** |

Настоящая фармакопейная статья распространяется на фармацевтическую субстанцию Найя найя (Найя трипудианс) – Naja naja (Naja tripudians), и получаемые из нее разведения, используемые в качестве субстанции для производства/изготовления гомеопатических лекарственных препаратов.

Высушенный яд индийской кобры (очковой змеи) - *Naja naja* L. (*Naja tripudians* Merr.), сем. аспидовые змеи – *Elapidae*.

**Описание.** Желтовато-белое, хрупкое, аморфное вещество.

**Растворимость**. Легко растворим в воде, растворим с растиранием в глицерине и спирте 60 %.

**Подлинность**

*Испытуемый раствор.* 10 мг субстанции растворяют в 5 мл воды.

***Качественная реакция***

К 1 мл испытуемого раствора прибавляют 1,5 мл нингидрина раствора 0,4 %; должно появиться фиолетовое окрашивание.

***Изоэлектрическое фокусирование.*** В соответствии с требованиямиОФС «Изоэлектрическое фокусирование».

*Приготовление растворов*

*Раствор глицерина 10 %.* В стакан вместимостью 100 мл помещают 10 г глицерина, прибавляют 70-80 мл воды и перемешивают на магнитной мешалке до полного растворения. Полученный раствор переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Срок годности 6 мес при хранении при температуре от 2 до 8 °С.

*Мочевины раствор 7,3* *М*. 8,8 г мочевины помещают в стакан вместимостью 100 мл, добавляют около 15 мл воды и растворяют при постоянном перемешивании на магнитной мешалке при температуре 40 – 50 °С. Полученный раствор переносят в мерную колбу вместимостью 20 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

*Фиксирующий раствор*. 115,0 г трихлоруксусной кислоты помещают в колбу вместимостью 1000 мл, добавляют 700 мл воды и растворяют при постоянном перемешивании на магнитной мешалке. К полученному раствору добавляют 34,5 г сульфосалициловой кислоты и растворяют при постоянном перемешивании на магнитной мешалке. Затем переносят в мерную колбу вместимостью 1000 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Срок годности 3 мес при хранении при температуре от 15 до 30 °С.

Отмывающий раствор. В мерную колбу вместимостью 1000 мл вносят 250 мл спирта 96 % и 80 мл уксусной кислоты, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Срок годности 6 мес при хранении при температуре от 15 до 30 °С.

Окрашивающий раствор Кумасси R-250 (*кислотный синий 83)*. В колбу вместимостью 500 мл помещают 160 мл спирта 96 %, осторожно прибавляют 0,1 г Кумасси  R-250, растворяют при постоянном перемешивании на магнитной мешалке в течение 3 - 5 мин, прибавляют 200 мл воды и перемешивают на магнитной мешалке в течение 3 – 5 мин. Затем добавляют 40 мл уксусной кислоты и перемешивают на магнитной мешалке в течение 3 – 5 мин.

Срок годности раствора - 6 мес при хранении при температуре от 15 до 30 °С.

*Раствор сравнения*. Смесь не менее четырех подходящих белков (коммерческий набор маркеров) с диапазоном изоэлектрических точек 5,0 – 10,8.

*Полиакриламидный гель*. Для заливки геля помещают стекло без спейсеров 125 × 260 × 3 мм на ровную твердую поверхность. На стекло укладывают пленку для изоэлектрического фокусирования (ИЭФ) гидрофильной (на которой бумага) стороной вверх. Удаляют бумагу с поверхности пленки. Стекло со спейсерами 125 × 260 × 0,5 мм помещают на пленку для ИЭФ спейсерами вниз. Стекла и пленку для ИЭФ фиксируют с помощью зажимов для стекол.

В пластиковую пробирку вместимостью 50 мл помещают 3,8 мл основного 30 % раствора акриламида, 12,8 мл мочевины раствора 7,3 М, 1,2 мл смеси амфолитов рH 3 – 10 и осторожно перемешивают.

Подготовленный раствор акриламида с амфолитами непосредственно перед полимеризацией помещают на магнитную мешалку, прибавляют 92 мкл аммония персульфата раствора 10 % и 28 мкл ТЕМЕД и перемешивают.

Полученный раствор заливают в подготовленную форму. Время полимеризации геля составляет 30 - 40 мин, после чего снимают зажимы для стекол и осторожно освобождают от стекол подложку с гелем.

*Подготовка фокусирующей аппаратуры*.

Охлаждающее устройство устанавливают на температуру 5 °С. После полимеризации геля две стеклянные пластины вскрывают так, чтобы не повредить гель, смачивают рабочую поверхность прибора глицерина раствором 10 % с помощью пипетки Пастера и переносят гель на предварительно охлажденную рабочую поверхность прибора для изоэлектрофокусирования.

Катодную (-) полоску для электрода смачивают натрия гидроксида раствором 1 М и помещают его продольно поперек катодного края геля.

Анодную (+) полоску для электрода смачивают фосфорной кислоты раствором 0,5 М и помещают его продольно поперек анодного края геля.

Предварительное фокусирование геля:

Электроды устанавливают на поверхности геля, непосредственно на середину катодной и анодной полоски для электродов и подсоединяют к источнику питания.

Устанавливают в источнике питания следующие параметры:

напряжение 1000 В (линейный градиент), ток не более 24 мА, мощность не более 20 Вт, время 45 мин.

*Нанесение образцов на гель*.

После завершения предыдущей программы выключают источник питания и располагают на поверхности прямоугольного поля геля на расстоянии 1 – 2 см от катода полоски для нанесения образцов (размером 0,5 × 1 см, сделанные из фильтровальной бумаги). На полоски наносят по 10 мкл испытуемого раствора и раствора сравнения.

Устанавливают электроды на поверхности геля, непосредственно на середину катодной и анодной полоски для электродов и подсоединяют электроды к источнику питания.

Устанавливают в источнике питания следующие параметры:

напряжение 500 В (ступенчатый градиент), ток не более 24 мА, мощность не более 20 Вт, время 30 мин.

*Фокусирование геля*:

После завершения предыдущей программы выключают источник питания и удаляют полоски для нанесения образцов. Устанавливают электроды на поверхности геля непосредственно на середину катодной и анодной полоски для электродов и подсоединяют электроды к источнику питания.

Устанавливают в источнике питания следующие параметры: напряжение 2000 В (ступенчатый градиент), ток не более 14 мА, мощность не более 14 Вт, время 120 мин.

*Обострение полос*:

Устанавливают в источнике питания следующие параметры: напряжение 2500 В (ступенчатый градиент), ток не более 14 мА, мощность не более 24 Вт, время 10 мин.

*Окраска геля Кумасси  R-250*:

После завершения фокусирования выключают прибор и помещают гель в пластиковый контейнер с крышкой с 300 мл фиксирующего раствора. Инкубируют при перемешивании на встряхивателе при температуре 37 °С со скоростью 300 об/мин в течение 30 мин, 2 раза промывают водой и выдерживают в течение 5 мин в 300 мл отмывающего раствора при тех же условиях. Затем промывают 2 раза водой и добавляют 200 мл раствора для окрашивания Кумасси R-250. Выдерживают на встряхивателе при комнатной температуре в течение 12 - 16 час. Сливают раствор для окрашивания Кумасси R-250 и промывают гель водой 3 раза.

200 – 300 мл отмывающего раствора в пластмассовом контейнере помещают в микроволновую печь на 2 мин при мощности около 800 Вт. Подложку с гелем переносят в нагретый отмывающий раствор, кладут в емкость бумажную салфетку и выдерживают на встряхивателе при температуре 37 °С со скоростью 300 об/мин под тягой до полной отмывки фона. Салфетки меняют по необходимости. Затем сливают отмывающий раствор, промывают гель водой 2 - 3 раза по 3 – 5 мин.

На электрофореграмме испытуемого раствора в области анода должна обнаруживаться полоса примерно при рН 5,0, могут также присутствовать некоторые дополнительные слабые полосы, в области катода должны обнаруживаться полоса непосредственно над линией нанесения, полоса при рН 8,8, одна слабая полоса и две или три сильные полосы между рН 9,8 и 10,8; допускается обнаружение других полос.

**Посторонние примеси**

1. Нескольких частиц субстанции помещают на предметное стекло микроскопа и прибавляют около 0,05 мл нингидрина раствора 0,2 %, накрывают покровным стеклом и недолго нагревают до кипения; под микроскопом не должно обнаруживаться частиц, не окрашенных в фиолетовый цвет.

2**.** Нескольких частиц субстанции помещают на предметное стекло микроскопа и прибавляют около 0,05 мл калия йодида йодированного раствора, накрывают покровным стеклом и просматривают под микроскопом; не должно быть никаких черных частиц в дополнение к коричневым частицам.

3. 1 мл испытуемого раствора (см. раздел «Подлинность») разводят до 10 мл водой и измеряют оптическую плотность полученной смеси в интервале длин волн между 220 и 400 нм; кроме максимума около 280 нм других максимумов поглощения не должно наблюдаться.

**Разведения**

**Особенности технологии разведений**

Для получения раствора D2 0,3 части субстанции растворяют в 0,7 частях воды и смешивают с 99 частями глицерина 85 %. Последующие разведения готовят в соответствии с ОФС «Растворы и жидкие разведения гомеопатические», используя для разведений от D3 до D6 глицерин 85 %, последующие разведения готовят с использованием спирта 43 % (м/м).

Тритурацию D2 готовят из 0,3 частей субстанции и 99,7 частей лактозы моногидрата. Последующие тритурации готовят в соответствии с ОФС «Тритурации гомеопатические».

**Описание**

Раствор D2 – бесцветная, прозрачная или слегка мутная жидкость.

Тритурация D2 – белый порошок.

**Подлинность**

1. 3 мл раствора D2 разбавляют 2 мл воды; полученный раствор дает реакции подлинности для субстанции.

2. 0,5 г тритурации D2 растворяют в 2 мл воды, прибавляют 0,5 мл нингидрина раствора 0,4 % и нагревают; должно наблюдаться фиолетовое окрашивание.

3. К 0,3 г тритурации D2 прибавляют 4 мл воды и встряхивают в течение 10 мин, 2 мл смеси подвергают ультрафильтрации (М.м. 10000). Фильтр промывают 0,2 мл воды; фильтрат должен давать реакцию подлинности для субстанции «Изоэлектрическое фокусирование».

**Прозрачность раствора.** Мутность раствора D2 не должна превышать опалесценцию смеси из 0,1 мл исходного эталона и 9,9 мл воды (ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей»).

**Цветность раствора**. Степень окраски раствора D2 должна быть не менее степени окраски эталона GY6 и не должна превышать степень окраски эталона GY3 (ОФС «Степень окраски жидкостей», метод 2).

**Хранение**. В защищенном от света месте, при температуре от 2 до 8 оС.

Хранить с особой осторожностью.