**Полипептиды ФС**

**шишковидной железы [эпифиза]**

**крупного рогатого скота,**

**экстракт сухой Вводится впервые**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на субстанцию полипептидов шишковидной железы [эпифиза] крупного рогатого скота экстракт сухой.

ПРОИЗВОДСТВО

Экстракт сухой выделяют из шишковидной железы (эпифиза) крупного рогатого скота, не достигшего 12-месячного возраста, содержащей комплекс полипептидов и применяемый в качестве полупродукта, подлежащего дальнейшей переработке, для производства лекарственных средств,

Качество сырья (микробиологические показатели, содержание токсичных элементов, антибиотиков и др.) не должно превышать показателей, установленных нормативной документацией, действующей на территории Российской Федерации.

Производство субстанции должно проводиться в условиях соблюдения правил надлежащей производственной практики и в соответствии с требованиями ОФС «Фармацевтическая субстанция животного происхождения».

ИСПЫТАНИЯ

**Описание.** Неоднородный порошок от белого цвета с коричневым оттенком до желто-коричневого с сероватым оттенком. Аморфный гигроскопичный.

**Растворимость.** Практически нерастворим в воде, диметилсульфоксиде и н-гексане.

**Подлинность.**

*1. Качественная реакция*

В пробирку переносят 0,1 г экстракта, прибавляют 5 мл воды и интенсивно взбалтывают в течение 5 мин, полученный раствор фильтруют через бумажный фильтр. К 2 мл фильтрата приливают 2 мл биуретового реактива - появляется окраска от сине-фиолетового до фиолетового цвета.

*2. Спектрофотометрический.* Ультрафиолетовый спектр раствора Б, приготовленного для количественного определения экстракта, в области длин волн от 255 до 300 нм должен иметь максимум при длине волны 264 - 276нм. (ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях»)

**рН.** От 5,0 до 7,0 (раствор А, приготовленный для количественного определения препарата). Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

**Тяжелые металлы.** Не более 0,001 % в зольном остатке, полученном после сжигания 1,0 г (точная навеска) экстракта. (ОФС. «Тяжелые металлы», метод 2). Используют эталонный раствор 1.

**Цинк.** Не более 10 % в пересчете на сухое вещество. Определение проводят методом ААС.

Стандартный раствор А (10 мкг/мл). 1,0 мл стандартного образца раствора цинка (1000 мкг/мл) или 2,0 мл стандартного образца раствора ионов цинка (500 мкг/мл) переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Раствор должен быть свежеприготовленным.

Испытуемый раствор. Около 50,0 мг (точная навеска) экстракта сухого помещают в кварцевый тигель, прибавляют 10 мл азотной кислоты, помещают тигель на плитку и выпаривают до влажного остатка. К осадку прибавляют 20 мл 1% раствора азотной кислоты и перемешивают до полного растворения осадка. Раствор количественно переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл, промывают тигель 4-5 мл воды и также переносят в мерную колбу, доводят объем раствора водой до метки (раствор Б) и перемешивают. 0,5 мл раствора Б переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора до метки 0,01 М раствором хлористоводородной кислоты и перемешивают.

Раствор должен быть свежеприготовленным.

Калибровочные растворы цинка. В мерные колбы вместимостью 50 мл помещают 0,50 мл, 1,00 мл и 1,50 мл стандартного раствора А, доводят объемы растворов до метки 0,01 М раствором хлористоводородной кислоты и перемешивают. Концентрация цинка в полученных растворах составляет 0,1 мкг/мл, 0,2 мкг/мл и 0,3 мкг/мл соответственно.

Растворы должны быть свежеприготовленными.

*Контрольный раствор.* В кварцевый тигель помещают 10 мл азотной кислоты, помещают тигель на плитку и выпаривают до влажного остатка. К влажному остатку прибавляют 20 мл 1% раствора азотной кислоты и перемешивают до полного растворения осадка. Раствор количественно переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл, промывают тигель 4-5 мл воды и также переносят в мерную колбу, доводят объем раствора водой до метки (раствор В) и перемешивают. 0,5 мл раствора В переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора до метки 0,01 М раствором хлористоводородной кислоты и перемешивают.

Раствор должен быть свежеприготовленным.

В случае дополнительного разведения испытуемого раствора для того, чтобы ожидаемая конечная концентрация в них лежала внутри калибровочного графика, проводят дополнительное разведение контрольного раствора в том же соотношении.

Базовую линию устанавливают по холостому раствору (0,01 М раствор хлористоводородной кислоты). Калибровочные растворы последовательно вводят в пламенный атомизатор атомно-абсорбционного спектрофотометра и регистрируют величину абсорбции не менее шести раз для каждого раствора.

Калибровочный график, представляющий собой прямолинейную зависимость величины абсорбции от концентрации цинка в калибровочном растворе, строится автоматически с помощью программного обеспечения прибора.

Перед каждым анализом проводят калибровку прибора. Прибор считается пригодным к работе, если выполняются следующие условия:

* относительное стандартное отклонение, рассчитанное по шести последовательным измерениям калибровочного раствора с концентрацией 0,2 мкг/мл, составляет не более 1,4%;
* коэффициент корреляции калибровочного графика должен составлять не менее 0,995.

В пламенный атомизатор атомно-абсорбционного спектрофотометра последовательно вводят контрольный и испытуемый растворы и регистрируют величину абсорбции не менее трех раз. Концентрацию цинка в испытуемом растворе в мкг/мл определяют по калибровочному графику с помощью программного обеспечения прибора.

Содержание цинка в экстракте сухом в пересчете на сухое вещество в процентах (X) рассчитывают по формуле:

X= $\frac{(C-C\_{0})∙50∙100∙100∙100∙N }{a∙0,5∙10^{3} ∙(100-W)}$ = $\frac{(C-C\_{0})∙100000∙N }{a∙(100-W)}$, где

С - концентрация цинка в испытуемом растворе, определенная по калибровочному графику, в микрограммах/миллилитр;

Со - концентрация цинка в контрольном растворе, определенная по калибровочному графику, в микрограммах/миллилитр;

50 - объем мерной колбы для приготовления раствора Б, в миллилитрах;

100 - объем мерной колбы, взятой для разведения раствора Б, в миллилитрах;

100 - коэффициент пересчета, в процентах;

N - коэффициент, учитывающий дополнительное разведение испытуемого раствора;

а - навеска экстракта сухого, в миллиграммах;

0,5 - аликвота раствора Б, взятого для приготовления испытуемого раствора, в миллилитрах;

10' - коэффициент пересчета в микрограммы;

W - потеря в массе при высушивании, в процентах.

**Потеря в массе при высушивании.** Не должна превышать 15 %. Около 0,5 г экстракта (точная навеска) высушивают при температуре от 100 до 105 °С до постоянной массы (ОФС «Потеря в массе при высушивании»).

**Остаточные органические растворители.** Содержание ацетона должно быть не более 1,0 %, уксусной кислоты - не более 0,8 %. Определение проводят методом газовой хроматографии (ГХ) путем анализа равновесной паровой фазы (ОФС «Остаточные органические растворители»).

**Аномальная токсичность.** Должна быть нетоксична. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность».

Испытуемый раствор. Расчет навески экстракта сухого (Мх) проводят, основываясь на количественном определении содержания пептидов в 1 мг экстракта по следующей формуле:

Мх =$\frac{0,1}{m\_{x}}$ $∙20∙5∙0,5∙1,5 , $где

mx- количество водорастворимых полипептидов в 1 мг экстракта сухого согласно результатам анализа по показателю «Количественное определение», мг/мг;

0,1 - минимальное допустимое содержание водорастворимых

полипептидов в 1 мг экстракта сухого, мг/мг;

20 - концентрация испытуемого раствора, мг/мл;

5 - количество животных в группе;

0,5 - объем введения испытуемого раствора одному животному;

1,5- коэффициент запаса.

**Микробиологическая чистота.** Должен соответствовать категории 3. 2.(табл.2) (ОФС «Микробиологическая чистота»).

**Биологическая активность.** Субстанцию считают биологически активной, если средняя относительная масса матки подопытной группы животных, получавших гонадотропин хорионический и экстракт сухой, не менее, чем на 15 % меньше средней относительной массы матки животных второй контрольной группы, получавших только гонадотропин хорионический.

Приготовление растворов

Испытуемый раствор. 0,5 г экстракта, растирают в фарфоровой ступке. В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 0,3 г измельченного препарата, доводят объем до метки раствором натрия хлорида изотонического 0,9 % для инъекций. Перемешивают с помощью магнитной мешалки в течение 30 минут, затем фильтруют через бумажный фильтр.

Отфильтрованную жидкость подвергают стерилизующей фильтрации через стерилизующий мембранный фильтр

Раствор готовят непосредственно перед введением животным.

Раствор гонадотропина хорионического. Гонадотропин хорионический разводят раствором натрия хлорида изотонического 0,9 % для инъекций с таким расчетом, чтобы в 0,6 мл раствора содержалось 1,5 ЕД гонадотропина хорионического.

Раствор хранят при температуре от 4 до 10 °С в течение 3 дней.

Крыс одного возраста не старше 25 дней распределяют на 3 группы (2 контрольные и 1 подопытную) способом случайного выбора с отклонением от средней массы в группе не более чем на ±3 г. В каждой группе должно быть не менее 10 животных.

Животным первой контрольной группы ежедневно в течение 3-х дней подкожно вводят по 0,2 мл 0,9 % раствора натрия хлорида для инъекций.

Животным второй контрольной группы в течение 3-х дней подкожно в левый бок вводят по 0,2 мл раствора гонадотропина хорионического, одновременно в правый бок подкожно вводят по 0,2 мл 0,9 % раствора натрия хлорида для инъекций.

Животным подопытной группы вводят ежедневно в течение 3-х дней подкожно в левый бок по 0,2 мл раствора гонадотропина хорионического, одновременно в правый бок вводят по 0,2 мл испытуемого раствора пинеамина.

На 4-ый день всех животных эвтаназируют, вскрывают брюшную полость, полностью извлекают матку (рога и непарную часть), очищают ее от окружающих тканей, подсушивают фильтровальной бумагой и взвешивают с точностью до 1 мг.

При вскрытии следует внимательно осмотреть внутренние органы животных; если животное оказывается больным, оно не учитывается в опыте.

При подсчете средней массы матки животных второй контрольной группы в расчет не принимают значения массы матки 1 - 2 животных, которые оказались нечувствительны к гонадотропину. Если таких животных больше двух, в расчет не принимают только два самых низких значения.

Средняя масса матки животных второй контрольной группы, получавших гонадотропин хорионический, должна превышать среднюю массу матки животных первой контрольной группы.

При подсчете средней массы матки животных подопытной группы в расчет не принимают значения массы матки 1 - 2 животных, равные или большие средней массы матки животных второй контрольной группы. Если таких животных больше двух, из расчета исключают только два самых больших значения.

Затем рассчитывают массу матки относительно массы животного отдельно для каждого животного и среднюю относительную массу матки для каждой группы животных.

Биологическую активность экстракта (А) в процентах определяют по уменьшению средней относительной массы матки животных подопытной группы по сравнению со средней относительной массой матки животных второй контрольной группы, получавших гонадотропин хорионический, и рассчитывают по формуле:

А = $\frac{m-M}{M}$ $∙$ 100 %

где m- среднеарифметическая относительная масса матки крыс, получавших гонадотропин (вторая контрольная группа);

М - среднеарифметическая относительная масса матки крыс, получавших гонадотропин и пинеамин.

**Количественное определение.** Содержание полипептидов должно быть не менее 0,1 мг на 1 мг экстракта в пересчете на сухое вещество.

*Раствор А* В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают около 1,5 г экстракта (точная навеска) прибавляют 20 мл воды. Перемешивают с помощью магнитной мешалки в течение 30 мин, затем доводят объем водой до метки и перемешивают. Содержимое колбы фильтруют через бумажный фильтр

*Раствор Б* В мерную колбу вместимостью 100 мл переносят 2,5 мл раствора доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. 5 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Измеряют оптическую плотность полученного раствора на спектрофотометре при длине волны 220 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, используя в качестве раствора сравнения воду.

Содержание полипептидов в мг на 1 мг экстракта вычисляют по формуле:

X = $\frac{A\_{220 }∙25∙100∙50∙1000∙100}{a∙2,5∙5∙110∙100∙(100-W)}$ *=* $\frac{A\_{220 }∙25∙100∙1000}{a∙2,5∙11∙(100-W)}$ *,* где

А220 - оптическая плотность исследуемого раствора;

25, 100, 50 - объемы мерных колб для приготовления исследуемого раствора, мл;

a - навеска экстракта, мг;

110 - удельный показатель поглощения пептидов при длине волны

2,5; 5 - объем исследуемого раствора, мл;

1000/100 - коэффициент пересчета процентного содержания в мг/мл;

100/(100-W) - пересчет на сухое вещество;

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