**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

 **\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_**

**Аспарагиназа, лиофилизат ФС**

**для приготовления раствора**

**для внутривенного и**

**внутримышечного введения**

***Asparaginasum*, *lyophilisatum***

***pro solutionis pro injectionibus***

***intravenosa et intramusculari* Взамен ФС 42-2952-93**

 Настоящая фармакопейная статья распространяется на лекарственный препарат Аспарагиназа, лиофилизат для приготовления раствора для внутривенного и внутримышечного введения является ферментом - 5000 МЕ и 10000 МЕ, катализирующий расщепление аминокислоты - аспарагина, необходимой для жизнедеятельности клеток. Препарат должен соответствовать требованиям указанным ниже.

  **Описание.** Лиофильно-высушенная масса белого или почти белого

цвета. Определение проводят визуально.

 Восстановленный раствор. Прозрачный бесцветный раствор. Определение проводят визуально.

 **Время растворения**. Не более 2 мин. Содержимое флакона растворяют в 2 или 4 мл воды для инъекций в зависимости от дозировки 5000 МЕ или 10000 МЕ.

 **Подлинность**

*Аспарагиназа*

 Определение проводят одним из 2-х методов: методом тонкослойной хроматографии в соответствии с ОФС «Тонкослойная хроматография» или методом электрофореза в полиакриламидном геле в соответствии с ОФС « Электрофорез в полиакриламидном геле».

*Метод тонкослойной хроматографии*

 Основное пятно на хроматограмме испытуемого раствора по положению, размеру и интенсивности окраски должно соответствовать основному пятну на хроматограмме стандартного раствора аспарагиновой кислоты.

 На линию старта хроматографической пластинки размером 10 х 20 см наносят по 10 мкл испытуемого раствора и раствора СО аспарагиновой кислоты. Пластинку высушивают на воздухе в течение 5 мин, помещают в камеру со смесью растворителей этанол-вода (63:37) и хроматографируют восходящим методом. После прохождения фронта подвижной фазы 10 см от линии старта, пластинку вынимают из камеры, высушивают на воздухе, опрыскивают 2 % раствором нингидрина и нагревают в течение 10 мин при температуре 90 ºС.

На хроматограмме испытуемого раствора должно быть обнаружено:

 - основное пятно с R1 около 0,7, аспарагиновой кислоты;

 - дополнительное пятно R2 около 0,6, L-аспарагина.

 *Испытуемый раствор.* Используют раствор для определения подлинности аспаргиназы, приготовленный как указано в разделе «Количественное определение. Ферментативная активность». Раствор используется свежеприготовленным.

 *Стандартный раствор аспарагиновой кислоты*. Около 27,8 мг (точная навеска) СО аспарагиновой кислоты помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, растворяют в воде для инъекций и доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают (концентрация аспарагиновой кислоты около 2,7 мг/мл). Раствор используется свежеприготовленным.

 *2 % раствор нингидрина.*1 г нингидрина растворяют в 50 мл ацетона и перемешивают. Раствор используется свежеприготовленным.

*Метод элетрофореза в полиакриламидном геле.*

На электрофореграмме испытуемого раствора должна присутствовать основная полоса с молекулярной массой около 35000, соответствующая по положению основной полосе на электрофореграмме раствора стандартного образца (СО) аспарагиназы.

 Определение проводят в соответствии с ОФС «Электрофорез в полиакриламидном геле».

 *Проверка пригодности системы*

 - на электрофореграмме стандартного раствора белков-маркеров должны присутствовать полосы, соответвующие маркерам молекулярной массы, равномерно распределенным не менее чем на 2/3 длины геля;

 - основная полоса испытуемого раствора должна соответствовать по положению и интенсивности стандартному раствору.

 *-* на электрофореграмме испытуемого раствора должна присутствовать основная полоса с молекулярной массой около 35000 аспарагиназы.

 Пластины с готовым гелем (приготовление геля указано в ОФС «Электрофорез в полиакриламидном геле») присоединяют к прибору для вертикального электрофореза и заполняют верхнюю и нижнюю камеры электродным буферным раствором 10х, рН 8,3. В лунки 1-4 наносят по 10 мкл растворы в следующей последовательности: 1 – Стандартный раствор белков - маркеров; 2 - Буферный раствор для образцов (2х) с 2 меркаптоэтанолом; 3 – Испытуемый раствор; 4 - Стандартный раствор. Далее прибор подключают к источнику питания, устанавливают напряжение 80 В. После того, как полоса бромфенолового синего проникнет в разделяющий гель, напряжение доводят до 150 В. Электрофорез прекращают, когда расстояние между полосой бромфенолового синего и нижнем краем пластины не достигнет 1-2 см.

 После окончания электрофореза гель освобождают от пластины, помещают в фиксирующий раствор на 30 мин, затем на 2 ч в красящий раствор Куммаси, далее гель отмывают специальным раствором до получения прозрачного фона геля вне зон расположения белков и далее обрабатывают закрепляющим раствором.

 Проводят оценку положения и интенсивность окраски основной полосы для испытуемого и стандартного растворов.

 *Испытуемый раствор.* Около 5,0 мг (точная навеска) препарата растворяют в 1 мл воды. К 100 мкл полученного раствора добавляют 150 мкл воды и 250 мл буферного раствора для образца по Лэммли с 2-меркаптоэтанолом, перемешивают на шейкере, выдерживают 5 мин в кипящей водяной бане, охлаждают до комнатной температуры и перемешивают (концентрация аспарагиназы около 1 мкг/мкл). Раствор используют свежеприготовленным.

 *Стандартный раствор.* Около 5,0 мг СО аспарагиназы растворяют в 1 мл воды для инъекций (концентрация аспарагиназы около 5 мкг/мкл). К 100 мкл полученного раствора прибавляют 150 мкл воды и 250 мкл буферного раствора для образца по Лэммли (2х) с 2 меркаптоэтанолом. Смесь тщательно перемешивают на шейкере, выдерживают 5 мин в кипящей водяной бане, охлаждают до комнатной температуры, перемешивают (концентрация аспарагиназы около 1мкг/мкл). Раствор используют свежеприготовленным.

*Стандартные растворы белков – маркеров.* Готовят стандартные растворы белков – маркеров согласно инструкции по приготовлению, используя готовые наборы белков с известными молекулярными массами от 6500 до 200000 с конечной концентрацией белков около 2 мкг/мкл. Растворы используют свежеприготовленными.

*Буферный раствор для образца по Лэммли (2х) с 2-меркаптоэтанолом.* 50 мкл 2-меркаптоэтанола смешивают с 950 мкл буферного раствора для образца по Лэммли (2х).

⨳Приготовление растворов для проведения вертикального электрофореза приведено в ОФС «Электрофорез в полиакриламидном геле».

*Маннитол*

 Время удерживания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора должно соответствовать времени удерживания основного пика на хроматограмме стандартного раствора маннитола.

 Определение проводят методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) по разделу «Количественное определение».

 **Прозрачность.** Должен быть прозрачным. Определение проводят визуально в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей».

**Цветность.** Должен быть бесцветным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей».

**Дозирование массы.** Испытание проводят в соответствии с ОФС «Однородность массы дозированных лекарственных форм».

 **рН.** От 6,5 до 7,5. Определение проводят потенциометрическим метод в соответствии с ОФС «Ионометрия».

 **Механические включения.** Видимые механические включениядолжны соответствовать требованиям, указанным в ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

 *Невидимые механические включения.* В одном флаконе количество механических включений размером 10 мкм и более не должно превышать 6000, а среднее количество частиц размером 25 мкм и более не должно превышать 600. Определение проводят в соответствии с ОФС «Невидимые механические включения, в лекарственных формах для парентерального применения».

**Определение воды.** Не более 6 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение воды». Метод 2. Микрометод (кулонометрический).

**Бактериальные эндотоксины.** Не более 2,9 ЕЭ/200 МЕ. Определение проводят в соответствии с ОФС «Бактериальные эндотоксины».

**Аномальная токсичность.** Должен быть нетоксичным. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Тест – доза 5000 МЕ аспарагиназы в 0,5 мл 0,9 % стерильного раствора натрия хлорида для инъекций на мышь, введение внутривенно. Срок наблюдения – 7сут.

**Стерильность.** Должен быть стерильным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Стерильность».

**Количественное определение**

*Аспарагиназа*

*Определение ферментативной активности, белка и удельной активности.*

*Ферментативная активность*

 Для дозировки 5000 МЕ – не менее 4250 МЕ и не более 5750 МЕ во флаконе; для дозировки 10000 МЕ – не менее 8500 МЕ и не более 11500 МЕ во флаконе. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение активности ферментативных лекарственных препаратов».

В 3 мерные колбы вместимостью 50 мл вносят по 40 мл воды. В первую колбу помещают 2 мл стандартного раствора аммония сульфата, во вторую – 2 мл рабочего испытуемого раствора, в третью - 2 мл холостого раствора 1. Содержимое колб перемешивают, прибавляют по 2 мл реактива Несслера, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Через 15 мин определяют оптическую плотность растворов при длине волны 450 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют холостой раствор 2.

*Проверка пригодности системы*

В 2 мерные колбы вместимостью 50 мл помещают по 40 мл воды. В каждую колбу добавляют по 2 мл стандартного раствора аммония сульфата. Содержимое колб перемешивают, прибавляют по 2 мл реактива Несслера, доводят объем раствора водой до метки и вновь перемешивают. Через 15 мин определяют оптическую плотность растворов при длине волны 450 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют холостой раствор 2.

Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

- допустимый диапазон значений оптической плотности должен быть от 0,4 до 0,5. При получении несоответствия значений оптической плотности стандартного раствора аммония сульфата заявленному диапазону готовят 2 параллельных стандартных растворов аммония сульфата из новых навесок этой соли и повторяют испытания;

- относительное стандартное отклонение значений оптической плотности, рассчитанное по 3 последовательным определениям каждого параллельного стандартного раствора аммония сульфата, должно быть не более 2 %.

За единицу активности принимают количество фермента, которое выделяет 1 микромоль аммиака из L-аспарагина в течение 1 мин при температуре 37 ºС и рН 8,0.

Ферментативную активность L-аспарагиназы в МЕ в одном флаконе (Х) вычисляют по формуле:

 $Х= \frac{(А\_{1}-А)∙а∙3∙2∙100∙100∙12,5∙50∙Р∙100·2∙10^{6}}{А\_{0}∙132,14∙100∙100∙50∙Ф∙5∙0,5∙2∙100∙15}$,

где:А1 – оптическая плотность рабочего испытуемого раствора;

 А - оптическая плотность холостого раствора 1;

А0- оптическая плотность стандартного раствора аммония сульфата;

 а – навеска аммония сульфата, г;

 Р – содержание основного вещества в аммония сульфате;

Ф – количество флаконов, взятое для приготовления испытуемого раствора (Ф = 4 для дозы 5000 МЕ и Ф = 2 для дозы 10000 МЕ)

 132,14 –молекулярная масса аммония сульфата, г/моль;

 2·106 – количество мкмоль аммиака в одном моле аммония сульфата;

 15- время реакции, мин.

*Испытуемый раствор.* Содержимое флаконов эквивалентное 20000 МЕ препарата, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл с помощью 0,01 М фосфатного буферного раствора рН 8,0, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают.

5 мл приготовленного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора 0,01 М фосфатным буферным раствором рН 8,0 до метки и перемешивают (концентрация аспарагиназы около 10 МЕ/мл) Раствор используют свежеприготовленным.

 *Стандартный раствор аммония сульфата.* Около 1,321 г (точная навеска) аммония сульфата, предварительно высушенного до постоянной массы при температуре 105 ºС, помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в воде, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают (концентрация аммония сульфата около 0,1 моль/л, концентрация аммиака около 0,2 моль/л). Раствор хранят при комнатной температуре в течение 1 мес.

3 мл приготовленного стандартного раствора аммония сульфата помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают (концентрация аммиака около 6 мкмоль/мл). Раствор используют свежеприготовленным.

 *0,01 М фосфатный буферный раствор рН 8,0.* 100 мл 0,1 М раствора калия фосфата двузамещенного помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Раствор хранят при комнатной температуре в течение 1 мес.

25 мл 0,1 М раствора калия фосфата однозамещенного помещают в мерную колбу вместимостью 250 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Раствор хранят при температуре от 15 до 25 º С в течение 1 мес.

Смешивают 50 мл 0,01М раствора калия фосфата однозамещенного и 500 мл 0,01 М раствора калия фосфата двузамещенного и при необходимости доводят рН раствора до 8,0 ± 0,05 растворами указанных солей. Раствор используют свежеприготовленным.

*Раствор L-аспарагина.* Около 0,33 г (точная навеска) L-аспарагина моногидрата помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 0,1 М фосфатном буферном растворе с рН 8,0, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

*Раствор трихлоруксусной кислоты.* 24,5 г трихлоруксусной кислоты помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в воде, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

 ***Белок***

Для дозировки 5000 МЕ – не более 34 мг во флаконе;

Для дозировки 10000 МЕ – не более 68 мг во флаконе.

*Метод спектрофотометрический (УФ)*

Измеряют оптическую плотность испытуемого раствора при длине волны 278 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют смесь вода-растворитель (1:9).

Содержание белка (Х) в одном флаконе в миллиграммах вычисляют по формуле:

 Х = $\frac{А\_{1} ∙ V ∙10∙10 }{Е\_{1см}^{1\%} ∙1∙1}, $

где: А1: оптическая плотность испытуемого раствора;

 V: объем воды взятый для приготовления восстановленного раствора, мл;

 $Е\_{1см}^{1\%}: $удельный показатель поглощения L-аспарагиназы при 278 нм, равный 7,1;

 10: коэффициент пересчета процентной концентрации в миллиграмм на миллилитр (1%=10 мг/мл).

 *Испытуемый раствор.*1,0 мл восстановленного препарата помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят объем раствора растворителем до метки и перемешивают (концентрация аспарагиназы около 250 МЕ/мл). Раствор используют свежеприготовленным.

 *Растворитель – 1% раствор натрия лаурилсульфата.* 10 г натрия лаурилсульфата помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, растворяют в воде, доводят объем раствора до метки и перемешивают. Раствор хранят при температуре от 15 до 25 ºС в течение 1 мес.

*Удельная активность*

Не менее 170 МЕ/мг белка (для дозировок 5000 МЕ и 10000 МЕ)

Метод расчетный

 Удельную активность препарата в международных единицах на миллиграм белка (Х) вычисляют по формуле:

 Х = $\frac{Х\_{1}}{Х\_{2}},$

 где: Х1 – ферментативная активность препарата в международных единицах;

 Х2 – содержание белка в одном флаконе, мг.

*Маннитол*

Для дозировка 5000 МЕ – не более 27, 5 мг во флаконе;

Для дозировки 10000 МЕ – не более 55, 0 мг во флаконе.

Определение проводят методом ВЭЖХ.

*Предлагаемые хроматографические условия:*

Колонка: 300 х 7,8 мм;

Температура колонки: 80 ºС;

Температура образцов: 5º С;

Детектор: диодноматричный, УФ, 191 нм;

Скорость потока: 0,5 мл/мин;

Объем введения пробы – 20 мкл;

Время регистрации хроматограммы: 30 мин

*Проверка пригодности хроматографической системы*

 В жидкостной хроматограф вводят по 20 мкл стандартного раствора (5 инжекций) а затем раствор для проверки пригодности хроматографической системы (1 инжекция) и регистрируют хроматограммы.

 Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

 - относительное стандартное отклонение времени удерживания пика маннитола вычисленное по5 оследовательнм хроматограммам, должно быть не более 2 %;

- относительное стандартное отклонение площади пика маннитола, вычисленное по 5 последовательным хроматограммам, должно быть не более 2 %;

- эффективность хроматографической колонки, вычисленная по пику маннитола на хроматограмме раствора СО маннитола, должна быть не менее 2000 теоретических тарелок;

- фактор асимметрии пика маннитола на хроматограмме раствора для проверки пригодности хроматографической системы должно быть не менее 2,0.

В жидкостной хроматограф вводят по 20 мкл стандартного раствора (3 инжекции) и испытуемого раствора (2 инжекции) и регистрируют хроматограммы.

 Содержание маннитола (Х) в одном флаконе в миллиграммах вычисляют по формуле:

 Х = $\frac{S\_{1}∙a∙2,5∙20∙P}{S\_{0}∙25∙1∙V∙100}$,

 где: S1: площадь пика маннитола на хроматограмме испытуемого раствора;

 S0: площадь пика маннитола на хроматограмме раствора СО маннитола;

 a: навестка СО маннитола, мг;

 P: содержание основного вещества в СО маннитола, %;

 V: объем раствора для дозировки 5000 -2 мл, для дозировка 10000- 1 мл.

 ⨳ *Испытуемый раствор.* Содержимое 1 флакона растворяют в 2,5 мл растворителя, прибавляя путем медленного вращения без взбалтывания, не допуская образования пузырьков.

 2,0 мл полученного раствора (для дозировки 5000 МЕ) или 1,0 мл (для дозировки 10000 МЕ) помещают в мерную колбу вместимостью 20 мл, доводят объем раствора растворителем до метки, перемешивают и фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм, отбрасывая первые 2 мл фильтрата (концентрация маннитола около 1,0 мг/мл). Раствор используется свежеприготовленным.

 *Стандартный раствор.* Около 25 мг (точная навеска) СО маннитола помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в растворителе, доводят объем раствора тем же растворителем до метки, перемешивают и фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм, отбрасывая первые 2 мл фильтрата (концентрация маннитола около 1,0 мг/мл). Срок хранения раствора в течение 24 ч.

 *Раствор для проверки пригодности хроматографической системы.* Около 10 мг (точная навеска) СО маннитола и около 10 мг СО сорбитола помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, растворяют в воде, доводят объем раствора до метки, перемешивают и фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм, отбрасывая первые 2 мл фильтрата (концентации маннитола и сорбитола около 1,0 мг/мл каждого).

⨳Приготовление растворителя приведено в разделе «Белок».

Хранение. В сухом, защищенном от света месте при температуре не выше 20 ºС в соответствии с ОФС «Хранение лекарственных средств».