**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |
| --- |
|  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Гиалуронидаза, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций и местного применения** |  | **ФС** |
| **Гиалуронидаза, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций и местного применения** |  |  |
| **Hyaluronidasi lyophilisatum pro solutione pro injectionibus et ad usum localem** |  | **Взамен ФС 42-2606-93** |

|  |
| --- |
|  |

Настоящая фармакопейная статья распространяется на лекарственный препарат гиалуронидаза, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций и местного применения. Препарат должен соответствовать требованиям ОФС «Лиофилизаты», ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения» и нижеприведенным требованиям. Препарат содержит гиалуронидазу, получаемую из семенников млекопитающих (например, бычьих).

Обладает не менее заявленной в одном флаконе гиалуронидазной активностью (МЕ).

Удельная активность должна быть не менее 85 ЕД.

**Описание.** Содержание раздела приводится в соответствии с ОФС «Лиофилизаты».

**Подлинность.** *Ферментативная активность.* Препарат должен обладать гиалуронидазной активностью (раздел «Количественное определение. Гиалуронидазная активность»).

**Время растворения.** Не более 2 мин (ОФС «Время растворения»). К содержимому флакона прибавляют указанное в прилагаемой инструкции по медицинскому применению препарата количество растворителя и непрерывно встряхивают до полного растворения. Визуально определяют время, за которое произошло полное растворение содержимого флакона.

**Прозрачность раствора.** Опалесценция раствора содержимого флакона в 10 мл воды не должна превышать эталон сравнения II (ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей»).

**Цветность раствора.** Раствор препарата, полученный в испытании «Прозрачность раствора», должен выдерживать сравнение с эталоном Y5 или BY5 или В5 (ОФС «Степень окраски жидкостей», метод 2).

**рН.** От 5,0 до 7,5 (раствор препарата, полученный в испытании «Время растворения», ОФС «Ионометрия», метод 3).

**Механические включения**

*Видимые*. В соответствии с ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

*Невидимые*. В соответствии с ОФС «Невидимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения».

**Потеря в массе при высушивании.** Не более 11,0 % (ОФС «Потеря в массе при высушивании», способ 1). Около 0,2 г (точная навеска) препарата высушивают до постоянной массы.

**Однородность дозирования.** В соответствии с ОФС «Однородность дозирования».

**Бактериальные эндотоксины.** Не более 0,2 ЕЭ на 1 МЕ (ОФС «Бактериальные эндотоксины»).

**Стерильность.** Препарат должен быть стерильным (ОФС «Стерильность»).

**Аномальная токсичность.** Препарат должен быть нетоксичным (ОФС «Аномальная токсичность»). Препарат растворяют в натрия хлорида растворе 0,9 % до концентрации гиалуронидазы 1280 МЕ/мл. Тест-доза − 0,5 мл (640 МЕ) полученного раствора на мышь, внутривенно. Срок наблюдения 48 ч.

**Количественное определение**

***1. Гиалуронидазная активность.***Определение проводят в сочетании с методом спектрофотометрии (ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях»).

Все раствор используют свежеприготовленными.

За единицу ферментативной активности принимают такое количество препарата, которое высвобождает 0,001 микроэквивалент глюкозамина за 1 мин в заданных условиях определения.

*Раствор А.* В мерную колбу вместимостью 1 л помещают 13,6 г натрия ацетата, растворяют в воде, прибавляют 8,5 г натрия хлорида, растворяют и доводят объём раствора водой до метки.

*Раствор Б.* В мерную колбу вместимостью 1 л помещают 6,0 мл уксусной кислоты ледяной, прибавляют 500 мл воды, 8,5 г натрия хлорида и доводят объём раствора водой до метки.

*Буферный раствор.* Раствор А—раствор Б 1:4, доведенный до значения рН 4,00±0,05 раствором Б.

*Раствор калия гидроксида.* В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 1,0 мл калия гидроксида раствор 45 % и доводят объём раствора водой до метки.

*Раствор калия тетрабората рН 9,4.* К 24,7 г борной кислоты прибавляют 500 мл воды и медленно, при постоянном перемешивании, смесь растворителей калия гидроксида раствор 45 %—вода 1:9 до полного растворения и доводят значение рН до 9,40±0,05 тем же растворителем. Полученным раствором титруют 20,0 мл буферного раствора до значения рН 8,9; на титрование должно пойти 20 мл раствора калия тетрабората рН 9,4. Если объём титранта превышает 20 мл, то к раствору калия тетрабората рН 9,4 прибавляют 0,1 мл смеси растворителей калия гидроксида раствор 45 %—вода 1:9 и титруют. Повторяют пока не будет достигнут указанный объем титранта.

*Испытуемый раствор.* Содержимое одного флакона растворяют в 5,0 мл буферного раствора.

*Стандартный раствор.* В мерную колбу вместимостью 5 мл помещают около 10 мг (точная навеска) стандартного образца гиалуронидазы, растворяют в буферном растворе и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

*Раствор субстрата.* Растворяют 20 мг натрия гиалуроната в 5,0 мл воды при температуре от 4 до 10 °С в течение 14-16 ч. К полученному раствору прибавляют 5,0 мл буферного раствора. Хранят при температуре от 2 до 8 °С не более 7 сут.

*Проведение анализа*

Определение гиалуронидазной активностисубстанции проводят по следующей схеме (время отмеряют точно по секундомеру):

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Пробирка | | | | |
| Опытная проба А | | Опытная проба Б | | Контрольная проба |
| № 1а | № 2а | № 1б | № 2б |
| Испытуемый раствор | 0,1 мл | | **–** | | **–** |
| Стандартный раствор | – | | 0,1 мл | | **–** |
| Буферный раствор | 0,2 мл | | 0,2 мл | | 0,3 мл |
| Термостатируют при температуре 37±0,1 °С в течение 5 мин. Последовательно с интервалом 30 с прибавляют: | | | | | |
| Раствор субстрата | 0,2 мл | 0,2 мл | 0,2 мл | 0,2 мл | 0,2 мл |
| Термостатируют при температуре 37±0,1 °С в течение 15 мин и выдерживают на ледяной бане в течение 5 мин. Последовательно с интервалом 30 с прибавляют: | | | | | |
| Раствор калия тетрабората рН 9,4 | 0,2 мл | 0,2 мл | 0,2 мл | 0,2 мл | 0,2 мл |
| Выдерживают на кипящей водяной бане в течение 3 мин и на ледяной бане в течение 5 мин. | | | | | |
| Диметиламино-бензальдегида солянокислого раствор в уксусной кислоте | 3 мл | | 3 мл | | 3 мл |
| Термостатируют при температуре 37±0,1 °С в течение 20 мин и охлаждают до комнатной температуры. | | | | | |

Измеряют оптическую плотность опытных проб на спектрофотометре в максимуме поглощения при длине волны 586 нм в кювете с толщиной слоя 1 см, используя в качестве раствора сравнения контрольную пробу.

Активность гиалуронидазы в одном флаконе в МЕ (*Аh*) вычисляют по формуле:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *А*0 | – | средняя оптическая плотность опытной пробы Б; |
|  | *А*1 | – | средняя оптическая плотность опытной пробы А; |
|  | *a*0 | – | навеска стандартного образца гиалуронидазы, мг; |
|  | *Аc* | – | активность стандартного образца гиалуронидазы, МЕ/мг. |

***2. Белок.*** Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение белка», метод 5.

*Испытуемый раствор.* Готовят раствор препарата в натрия хлорида растворе 0,9 % с концентрацией белка 4,5±1,5 мг/мл.

*Стандартные растворы.* В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают около 0,25 г (точная навеска) альбумина бычьего, растворяют в натрия хлорида растворе 0,9 % и доводят объём раствора тем же растворителем до метки. Получают растворы с концентрацией белка 1; 2; 4; 6 и 8 мг/мл.

Измеряют оптическую плотность испытуемого и стандартных растворов на спектрофотометре в максимуме поглощения при длине волны 600 нм в кювете с толщиной слоя 1 см.

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

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *C* | – | содержание белка, определенное по калибровочному графику, мг/мл; |
|  | *F* | – | фактор разведения испытуемого раствора, мл. |

**Удельная активность**

Удельную активность препарата в ЕД (*Аs*) вычисляют по формуле:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *Аh* | – | активность гиалуронидазы в одном флаконе, МЕ; |
|  | *Х* | – | содержание белка в одном флаконе, мг. |

**Хранение.** В сухом, защищенном от света месте при температуре не выше 15 °C.