МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |
| --- |
|  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Трипсин, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций и местного применения** |  | **ФС** |
| **Трипсин, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций и местного применения** |  |  |
| **Trypsini lyophilisatum pro solutione pro injectionibus et usum localem** |  | **Взамен ФС 42-3435-97** |

|  |
| --- |
|  |

Настоящая фармакопейная статья распространяется на лекарственный препарат трипсин, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций и местного применения. Препарат должен соответствовать требованиям ОФС «Лиофилизаты», ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения» и нижеприведенным требованиям.

Обладает протеазной активностью не менее 0,072 тирозиновых единиц ($ТЕ\_{35,5^{о}}^{НВ})$ на мг по Ансону и амидазной активностью не менее 3,6 нкат на мг.

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

**Подлинность**

*1.* *Протеолитическая активность*. Препарат обладает протеолитической активностью в условиях испытания «Количественное определение».

*2.* *Створаживающая активность*. Препарат не обладает створаживающей активностью.

*Раствор обезжиренного сухого молока*. Свежее натуральное коровье молоко центрифугируют в течение 30 мин при 7000-8000 об/мин, удаляют жировую фракцию, оставшийся раствор – лиофильно высушивают. Срок годности – 6 месяцев при хранении в тёмном прохладном месте. Растирают 0,75 г полученного обезжиренного сухого молока в ступке с небольшим количеством воды. Растёртую массу количественно переносят в мерный цилиндр вместимостью 50 мл, прибавляют 1 мл 3 М раствора кальция хлорида и 5 мл 1 М ацетатного буферного раствора, перемешивают и доводят объём раствора водой до отметки 50 мл.

*3 М раствор кальция хлорида*. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 65,7 г кальция хлорида шестиводного, растворяют в воде и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

*1 М ацетатный буферный раствор pH 5,6*. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 5,8 мл уксусной кислоты и доводят объём раствора водой до метки (раствор А). В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 13,6 г натрия ацетата, растворяют в воде и доводят объём раствора тем же растворителем до метки (раствор Б). Смешивают растворы А и Б в соотношении 5,5:44,5.

Точную навеску препарата, соответствующую 12,5 мг трипсина растворяют в 50 мл 0,1 М ацетатного буферного раствора pH 5,6. В 3 пробирки помещают по 3 мл раствора обезжиренного сухого молока. В две пробирки прибавляют по 0,5 мл полученного раствора препарата, в третью – 0,5 мл 0,1 М ацетатного буферного раствора. Содержимое пробирок взбалтывают, пробирки термостатитруют при 35 °C 10 мин. Раствор обезжиренного сухого молока не должен створаживаться.

**Время растворения.** Не более 1 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 20 мг препарата в 10 мл воды не должна превышать эталон сравнения I (ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей»).

**Цветность раствора**. Раствор препарата, приготовленный в испытании «Прозрачность раствора», должен выдерживать сравнение с эталоном R7 (ОФС «Степень окраски жидкостей», метод 2).

**рН**. От 3,0 до 5,5 (0,2 % водный раствор препарата, 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».

**Сульфаты.** Не более 0,001 % (ОФС «Сульфаты», метод 1). В 10 мл воды растворяют 20 мг препарата.

**Потеря в массе при высушивании**. Не более 10,0 % (ОФС «Потеря в массе при высушивании», способ 1). Для определения используют около 0,2 г (точная навеска) препарата.

**Пирогенность.** Препарат должен быть апирогенным. Тест-доза: объём препарата, соответствующий 0,1 мг трипсина, в 1 мл натрия хлорида раствора 0,9 % для инъекций на 1 кг массы кролика, внутривенно.

**Аномальная токсичность.** Препарат должен быть нетоксичным (ОФС «Аномальная токсичность»). Тест-доза – 0,25 мг трипсина в 0,5 мл натрия хлорида раствора 0,9 % для инъекций на мышь, внутримышечно. Срок наблюдения 48 ч.

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

**Количественное определение.** Определение проводят методом спектрофотометрии (ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях»).

***1. Протеазная активность***

Метод основан на определении количества тирозина, освобождаемого трипсином из гемоглобина в определённых условиях.

Препарат имеет активность в 1 тирозиновую единицу, если при воздействии её на субстрат в течение одной минуты освобождается такое количество продуктов гидролиза, не осаждаемых трихлоруксусной кислотой, которое при реакции с реактивом Фолина-Чокальтеусоответствует 1 миллиэквиваленту (мэкв) тирозина.

*Раствор гемоглобина 22 %.* 2,2 г сухого гемоглобина растворяют в воде и доводят объём раствора водой до 10 мл.

*Раствор субстрата.* К 8,0 мл натрия гидроксида раствора 1 М прибавляют 72,0 мл воды, 36,0 г мочевины и 10,0 мл раствора гемоглобина 22 %. Смесь термостатируют в течение 45±15 мин при 25 °С, после чего к ней прибавляют раствор 4 г мочевины в 10 мл1 М раствора калия дигидрофосфата. рН полученного раствора должен быть 7,5-8,0. Хранят при 5±3 °С не более 10 суток.

Испытуемый раствор. Точную навеску препарата, соответствующую около 50 мг трипсина, помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 25 мл 0,0025 М раствора хлористоводородной кислоты и перемешивают до растворения, доводят объём раствора тем же растворителем до метки. В мерную колбу вместимостью 200 мл помещают 2,5 мл полученного раствора и доводят объём раствора 0,0025 М раствором хлористоводородной кислоты до метки.

В контрольную и 2 опытные пробирки вносят по 5,0 мл субстрата. В контрольную пробирку прибавляют 10,0 мл трихлоруксусной кислоты раствора 0,3 М, 1,0 мл испытуемого раствора и тщательно перемешивают. Опытные пробирки и раствор препарата нагревают в водяной бане при 35,5±0,5 °С в течение ровно 3 минут.

К содержимому опытных пробирок прибавляют по 1,0 мл испытуемого раствора, тщательно перемешивают и выдерживают в термостате при той же температуре в течение ровно 10 минут. Затем в каждую опытную пробирку прибавляют по 10,0 мл трихлоруксусной кислоты раствора 0,3 М. После осаждения белков смесь выдерживают при комнатной температуре 30 минут, после чего фильтруют содержимое контрольной и опытных пробирок. В конические колбы вместимостью 25 мл вносят по 5,0 мл фильтрата, по 10,0 мл натрия гидроксида раствора 0,5 М и затем, при помешивании, по 3,0 мл разведенного реактива Фолина-Чокальтеу. Через 10 минут измеряют оптическую плотность растворов на спектрофотометре при длине волны 630 нм в кювете с толщиной слоя 1 см.

*Построение калибровочного графика.* Калибровочный график строят по стандартному раствору тирозина. Навеску, соответствующую 14,5 мг чистого тирозина, растворяют в 100 мл хлористоводородной кислоты раствора 0,2 М. Полученный исходный раствор содержит 8∙10–4 мэкв тирозина в 1 мл. Для получения стандартного раствора 10,0 мл исходного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят объём раствора 0,2 М раствором хлористоводородной кислоты до метки. 5 мл полученного раствора содержат 0,0008 мэкв (8 ∙ 10–4 мэкв) тирозина.

Для построения калибровочного графика готовят следующие разведения стандартного раствора:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| № | Стандартный раствор тирозина, мл | 0,2 М раствор хлористоводородной кислоты, мл | Содержание тирозина, мэкв∙10–4 |
| 1 | 5,00 | 0 | 8,00 |
| 2 | 4,00 | 1,00 | 6,40 |
| 3 | 3,00 | 2,00 | 4,80 |
| 4 | 2,00 | 3,00 | 3,20 |
| 5 | 1,75 | 3,25 | 2,80 |
| 6 | 1,50 | 3,50 | 2,40 |
| 7 | 1,20 | 3,80 | 1,92 |
| 8 | 1,00 | 4,00 | 1,60 |
| 9 | 0,50 | 4,50 | 0,80 |
| 10 | 0,25 | 4,75 | 0,40 |
| Контрольный опыт | 0 | 5,00 | 0 |

После этого к содержимому каждой пробирки прибавляют по 10 мл натрия гидроксида раствора 0,5 М и по 3 мл разведенного реактива Фолина-Чокальтеу. Через 10 минут измеряют оптическую плотность растворов на спектрофотометре при длине волны 630 нм в кювете с толщиной слоя 1 см, сравнивая с контрольным опытом. Затем строят калибровочный график, откладывая по оси абсцисс количество тирозина в миллиэквивалентах в пробе, а по оси ординат – соответствующие оптические плотности.

Из величины оптической плотности опытных растворов вычитают величину оптической плотности контрольного раствора и по найденной оптической плотности и калибровочному графику находят содержание тирозина в миллиэквивалентах в испытуемых растворах.

Количество тирозиновых единиц в 1 г препарата ($Х$) вычисляют по формуле:

$$X=\frac{C∙V∙16∙1000}{a∙5∙10}$$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *C* | − | содержание тирозина в опытной пробе, мэкв (среднее арифметическое из двух определений); |
|  | *V* | − | объём, в котором растворен препарат, мл; |
|  | *a* | − | навеска препарата, мг. |

Количество тирозиновых единиц в 1 ампуле или флаконе ($Х\_{1}$) вычисляют по формуле:

$$Х\_{1}=\frac{Х∙m}{1000}$$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *Х* | − | количество тирозиновых единиц в 1 г препарата, $ТЕ\_{35,5^{о}}^{НВ}$; |
|  | *m* | − | средняя масса препарата в ампуле (флаконе), мг. |

***2. Амидазная активность***

Метод основан на определении количества *п*-нитроанилина, освобождаемого трипсином из синтетического субстрата – гидрохлорида *N*α-бензоил-DL-аргинин-*п*-нитроанилида (БАПНА, CAS 911-77-3). Все растворы используются свежеприготовленными.

*Раствор п-нитроанилина.* Около 50 мг (точная навеска) нитроанилина растворяют в мерной колбе вместимостью 100 мл в смеси 0,1 М трис-гидрохлорид буферный раствор pH 7,8—диметилсульфоксид—5 М раствор кислоты уксусной 96:4:20.

В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 1 мл полученного раствора и доводят объём раствора той же смесью до метки. Получают раствор с концентрацией около 5 мкг/мл. При необходимости раствор дополнительно разбавляют так, чтобы оптическая плотность при длине волны 405 нм составляла 0,35±0,15. Измеряют оптическую плотность полученного раствора при длине волны 405 нм по сравнению со смесью 4,8 мл 0,1 М трис-гидрохлорид буферного раствора pH 7,8, 0,2 мл диметилсульфоксида и 1 мл уксусной кислоты раствора 5 М.

*Коэффициент наномолярной экстинкции* *п*-нитроанилина (*K*, л∙нмоль‑1∙см‑1) вычисляют по формуле:

$$K=\frac{A\_{405}∙138,12∙100∙100∙P}{a∙1 000 000}$$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *A*405 | − | оптическая плотность раствора *п*-нитроанилина при длине волны 405 нм; |
|  | *а* | − | навеска нитроанилина, мг; |
|  | 138,12 | − | молекулярная масса нитроанилина; |
|  | *P* | − | дополнительное разведение раствора *п*-нитроанилина (если применялось); |
|  | 1 000 000 | − | пересчёт мг в нг. |

*Испытуемый раствор.* Точную навеску препарата, соответствующую около 20 мг трипсина, помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 0,1 М трис-гидрохлорид буферном растворе pH 7,8 и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

*Раствор субстрата.* 100 мг (точная навеска) гидрохлорида БАПНА растворяют при 35±2 °С в 10 мл диметилсульфоксида. При хранении при температуре от 2 до 10 °С раствор пригоден для использования в течение 3 суток

*Проведение анализа.* В две опытные пробирки вместимостью 10 мл вносят по 4,6 мл 0,1 М трис-гидрохлорида буферного раствора pH 7,8, а в две контрольные пробирки – по 4,8 мл того же буферного раствора.

В опытные пробирки прибавляют по 0,2 мл испытуемого раствора. Все пробирки термостатируют в течение ровно 5 мин при 25,0 ± 0,5 °С. Во все пробирки в определенном порядке с интервалом 30 с прибавляют по 0,2 мл раствора субстрата и продолжают термостатирование при 25,0±0,5 °С в течение точно 15 мин. Для остановки реакции во все пробирки в том же порядке с интервалом в 30 с прибавляют по 1,0 мл уксусной кислоты раствора 5 М и перемешивают. Измеряют оптическую плотность растворов в опытных пробирках на спектрофотометре при длине волны 405 нм в кювете с толщиной слоя 1 см по сравнению с растворами в контрольных пробирках.

*Амидазную активность трипсина* (*X*) в нанокатал на мг препарата вычисляют по формуле:

$$X=\frac{A\_{405}∙6∙100}{K∙0,2∙900∙a}$$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *A*405 | − | средняя арифметическая оптическая плотность опытных растворов по сравнению с контрольными; |
|  | *а* | − | навеска препарата, мг; |
|  | *K* | − | коэффициент наномолярной экстинции *п*-нитроанилина, л∙нмоль‑1∙см‑1; |
|  | 900 | − | время гидролиза, с. |

**Общий белок.** Определение проводят методом спектрофотометрии (ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях»).

Содержимое одной ампулы (флакона) количественно переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в воде, доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

Измеряют оптическую плотность полученного раствора на спектрофотометре в максимуме поглощения при длине волны 280 нм в кювете с толщиной слоя 1 см. В качестве раствора сравнения используют воду.

Концентрацию белка (*Х*) в растворе трипсина в мг/мл вычисляют по формуле:

$$X=\frac{A\_{280}∙10}{14,4∙1}$$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *A*280 | − | оптическая плотность раствора трипсина при 280 нм; |
|  | *14,4* | − | удельный показатель поглощения ($E\_{1см}^{1\%}$) при 280 нм для концентрации белка 1 % и измерении в кювете с толщиной слоя 1 см; |
|  | *1* | − | толщина слоя раствора в кювете, см; |
|  | 10 | − | коэффициент, учитывающий перевод процентной концентрации в мг/мл. |

Для определения содержания белка в мг в 1 ампуле (флаконе) трипсина полученное значение концентрации белка в растворе трипсина умножают на объём, в котором растворили содержимое 1 ампулы (флакона).

Содержание белка в 1 ампуле (флаконе) препарата должно быть не менее 8,0 мг.

**Удельная активность.** Удельную активность трипсина (*УА*), выраженную в **(**$ТЕ\_{35,5^{о}}^{НВ})$, вычисляют по формуле:

$$УА=\frac{Х\_{1}}{m}$$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *Х1* | − | активность трипсина, содержащегося в 1 ампуле (флаконе), $ТЕ\_{35,5^{о}}^{НВ}$; |
|  | *m* | − | содержание белка в 1 ампуле (флаконе), мг. |

Удельная активность препарата должна быть не менее 0,006 $ТЕ\_{35,5^{о}}^{НВ}$на мг белка.

**Хранение**. В сухом, защищённом от света месте при температуре не выше 10 °С.