**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

**Полипептиды коры головного мозга скота ФС**

**Полипептиды коры головного мозга скота**

**Pecudum in cerebri cortex polypeptides Вводится впервые**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на полипептиды коры головного мозга скота экстракт сухой, который представляет собой комплекс полипептидных фракций, выделенный из коры головного мозга крупного рогатого скота или свиней не старше 12-месячного возраста.

Субстанция должна соответствовать ОФС «Биологические лекарственные препараты», ОФС «Фармацевтическая субстанция животного происхождения» и ниже приведенным требованиям.

**Описание.** Белый или желтоватый кристаллический порошок.

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

**Подлинность.**

*1. Качественная реакция.* В пробирку 50 мл помещают 0,1 г субстанции, растворяют в 5 мл воды перемешивают и фильтруют. К 2 мл фильтрата приливают 2 мл биуретового реактива должна появляться окраска от сине-фиолетового до фиолетового цвета.

*2. Спектрофотометрический.* Спектр поглощения полученного раствора субстанции, приготовленного для испытания «Количественное определение» в области длин волн от 250 до 300 нм должен иметь максимум при длине волны (275±6) нм. (ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях»)

**рН.** От 5,0 до 7,0 (ОФС «Ионометрия» метод 3).

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

**Цинк.** Не более 0,001 %. Определение проводят методом ААС.

*Испытуемый раствор.* 0,05 г субстанции помещают в коническую колбу со шлифом, прибавляют 50 мл разведенной хлористоводородной кислоты 7,3 % и осторожно кипятят с обратным холодильником в течение 1 ч. Фильтруют и промывают фильтр разведенной хлористоводородной кислотой 7,3 %. Объединенные фильтрат и промывочный раствор упаривают на водяной бане под вытяжкой досуха. Остаток растворяют в 0,1 М растворе хлористоводородной кислоты и доводят объём раствора тем же растворителем до 50,0 мл.

Растворы сравнения. Готовят растворы сравнения, содержащие 2 мкг/мл, 1 мкг/мл и 0,2 мкг/мл цинка путем доведения соответственно 2 мл, 1 мл и 0,2 мл стандартного раствора цинка 20 мкг/мл 0,1 М раствором хлористоводородной кислоты до 20,0 мл.

Источник излучения. Цинковая лампа с полым катодом.

Длина волны. 213,9 нм.

Атомизация. Воздушно-ацетиленовое пламя.

Определяют эффективные значения атомной абсорбции испытуемого раствора и растворов сравнения. По калибровочной прямой рассчитывают концентрацию цинка в субстанции.

**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 %. (ОФС «Остаточные органические растворители»).

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

**Микробиологическая чистота**. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

**Количественное определение.** Содержание полипептидов должно быть не менее 0,2 мг на 1 мг субстанции в пересчете на сухое вещество. Определение проводят методом спектрофотометрии (ОФС «Спектрофотометрия в УФ и видимой областях»).

*Испытуемый раствор.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают около 0,1 г субстанции (точная навеска) доводят объем водой до метки, перемешивают и фильтруют. 5 мл 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 1 см, используя в качестве раствора сравнения воду.

Содержание полипептидов в мг (Х) на 1 мг субстанции вычисляют по формуле:

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

где

А - оптическая плотность исследуемого раствора;

a - навеска субстанции, мг;

110 - удельный показатель поглощения пептидов при длине волны

W –потеря в массе при высушивании;

**Биологическая активность.** Субстанцию считают биологически активной, если индекс площади роста клеток (ИП) ткани головного мозга после культивирования с добавлением субстанции в концентрации 20 нг/мл, не менее чем на 20 % больше ИП в контроле. Количественную оценку влияния экстракта на рост ткани головного мозга эмбрионов выполняют морфометрическим методом.

*Питательная среда для культивирования*. Для культивирования используют среды следующего состава:

Раствор Хенкса

Питательная среда Игла МЕМ с L-глутамином

Фетальная сыворотка теленка

Глюкоза, раствор для внутривенного введения 40%

Гентамицин, раствор для инъекций 4%

*Испытуемый раствор.* Во флакон вместимостью 10 мл помещают 10 мг измельченной субстанции и добавляют питательную среду (1 мг/мл). Содержимое флакона выдерживают в течение 35 минут при комнатной температуре, затем с помощью пипетки тщательно перемешивают и полученную взвесь фильтруют. Отфильтрованную жидкость подвергают стерилизующей фильтрации.

Затем полученный стерильный образец (раствор А) путем последовательных разведений разводят до концентрации 20 нг/мл: отбирают 0,1 мл раствора А и прибавляют к 0,9 мл питательной среды (раствор Б) отбирают 0,1 мл раствора Б и прибавляют к 0,9 мл питательной среды (раствор В) далее отбирают 0,1 мл раствора В и прибавляют к 0,9 мл питательной среды (раствор Г) отбирают 1 мл раствора Г и прибавляют к 9 мл питательной среды (раствор Д) к 8 мл питательной среды прибавляют 2 мл раствора Д (испытуемый раствор 20 нг/мл).

Для проведения анализа используют 2-3 куриных эмбриона возрастом 9-12 суток. С помощью стерильных хирургических инструментов разрезают пленку, покрывающую головной мозг, глазным пинцетом извлекают головной мозг и помещают его в стерильную чашку Петри, в которой находится несколько капель среды Игла МЕМ или раствора Хенкса.

В каждом испытании используют шесть предварительно подготовленных стерильных чашек Петри для культуры ткани (диаметром 35-40 мм).

К поверхности чашки прикрепляют 12-14 эксплантатов нервной ткани размером около 0,5 мм, которые отделяют с помощью препаровальной иглы от головного мозга куриного эмбриона. Чашки закрывают и выдерживают 2-4 минуты в ламинарном шкафу при комнатной температуре.

Испытуемый раствор 20 нг/мл осторожно перемешивают пипеткой и в каждую из трех опытных чашек автоматической пипеткой-дозатором вносят по 3,0 мл. В контрольные чашки вносят по 3,0 мл питательной среды.

Опытные и контрольные чашки закрывают крышками и помещают на 48 - 50 часов в термостат с 5 % содержанием углекислого газа и температу­рой (37 ± 1) °С или помещают в эксикатор с содержанием углекислого газа 5 %, который затем помещают в термостат при температуре (37±1) °С.

Затем с помощью светового микроскопа, дополнительно оборудованного фотоаппаратом, проводят морфометрическое исследование опытных и контрольных чашек.

Для контрольных и опытных чашек рассчитывают индекс площади роста клеток (ИП) как отношение площади всего фрагмента нервной ткани, включая периферическую зону роста, к исходной площади эксплантата.

Интенсивность роста нервной ткани оценивают по величине ИП, который рассчитывают как отношение разности средних значений опытных ИПО и средних значений контрольных ИПК к среднему значению контрольного ИПК, выраженный в процентах.

**Хранение.** В соответствии с ОФС «Хранение лекарственных средств»