**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |
| --- |
|  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Трипсин + Химотрипсин, лиофилизат для приготовления раствора для местного и наружного применения** |  | **ФС** |
| **Трипсин + Химотрипсин** |  |  |
| **Trypsinum et Chymotrypsinum lyophilisatum pro solutione ad usum localem et externum** |  | **Взамен ФС 42-4-97** |

|  |
| --- |
|  |

Настоящая фармакопейная статья распространяется на лекарственный препарат трипсин + химотрипсин, лиофилизат для приготовления раствора для местного и наружного применения.

Во флаконе с препаратом должно содержаться не менее 0,225 тирозиновых единиц (Ед., TEHB35,5o).

Содержание белка во флаконе должно составлять от 43 до 53 мг.

**Описание**. Порошок или пористая масса белого или почти белого со слегка желтоватым оттенком цвета.

**Подлинность.**

*1.* *Протеолитическая активность.* Препарат должен обладать протеолитической активностью (раздел «Количественное определение. Протеолитическая активность»).

*2. Створаживающая активность.* Время створаживания субстрата препаратом должно быть не более 50 сек.

Створаживающую активность выражают временем, прошедшим с момента добавления ферментного препарата к субстрату при термостатировании проб в стандартных условиях при (35 ± 1) оС до появления первых признаков створаживания молока.

*1(0,1) М ацетатный буферный раствор pH 5,6.* В мер­ную колбу вместимостью 100 мл помещают 5,8 мл уксусной кислоты и доводят объем раствора водой до метки. В отдельную мер­ную колбу вместимостью 100 мл помещают 13,6 г натрия ацетата, растворяют в воде и доводят объем раствора водой до метки. Смешивают полученные растворы в соотношении 5,5:44,5. pH буферной смеси должен быть 5,6.

Для приготовления 0,1 М раствора 1 М буферный раствор разводят в 10 раз.

*Испытуемый препарат.* Около 12 мг препарата (точная навеска) растворяют в 4 мл 0,1 М ацетатного буферного раствора pH 5,6.

 *Раствор обезжиренного молока.* Растирают в ступке 0,75 г обезжиренного сухого молока с небольшим количеством воды. Растертую массу количественно переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл; добавляют 1 мл кальция хлорида раствора 3 М, 5 мл 1 М ацетатного буферного раствора pH 5,6 и доводят объем раствора водой до метки. Раствор используют свежеприготовленным.

В 3 пробирки помещают по 3 мл раствора обезжиренного молока и термостатируют при (35 ± 1) оС в течение 10 мин. В две из этих пробирок добавляют по 0,5 мл испытуемого препарата, в третью (контрольную) – 0,5 мл 0,1 М ацетатного буферного раствора pH 5,6. Содержимое пробирок перемешивают и термостатируют при (35 ± 1) оС).

В опытных пробах окончание реакции отмечают по появлению первых крупинок створоженного молока. В контрольной пробе молоко не должно свертываться при термостатировании в течение 60 мин. Наблюдения проводят в проходящем свете, время отмечают по секундомеру.

*3. УФ-спектр.* УФ-спектр раствора препарата 0,1 % в области от 240 до 300 нм должен иметь максимум поглощения при (279 ± 1) нм.

**Время растворения.** Не более 1 мин в натрия хлорида растворе 0,9 % или в воде из расчета 2 мл на 50 мг препарата (ОФС «Лиофилизаты»).

**Прозрачность раствора.** Раствор препарата 0,2 % должен быть прозрачным или выдерживать сравнение с эталоном I (ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей»).

**Цветность раствора.** Окраска раствора, полученного при испытании «Прозрачность раствора», не должна быть интенсивнее эталона Y7 (ОФС «Степень окраски жидкостей»).

**рН.** От 4,5 до 5,5 (раствор препарата 0,2 %). Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия», метод 3.

**Потеря в массе при высушивании.** Не более 7 %. Около 0,2 г (точная навеска) препарата сушат при (103 ± 2) °C до постоянной массы (ОФС «Потеря в массе при высушивании», способ 1).

**Сульфаты**. Должен соответствовать требованиям ОФС «Сульфаты», метод 1 (раствор препарата 0,2 %).

**Однородность массы.** От 45 до 55 мг во флаконе. Отклонение массы содержимого каждого флакона от средней массы не должно превышать ± 10 % (ОФС «Однородность массы дозированных лекарственных форм»).

**Аномальная токсичность.** Препарат должен быть нетоксичным. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность».

Тест-доза 0,25 мг препарата в 0,5 мл натрия хлорида раствора для инъекций 0,9 % на мышь, внутримышечно. Срок наблюдения 48 ч.

**Стерильность.** Должен быть стерильным. Испытание проводят методом прямого посева в соответствии с ОФС «Стерильность».

**Количественное определение. Протеолитическая активность**

# Определение протеолитической активности проводят путем гидролиза гемоглобина с помощью ферментного препарата в стандартных условиях с последующим спектрофотометрическим определением тирозина (ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях»).

Протеолитическую активность выражают в тирозиновых единицах (Ед., TEHB35,5o).

За единицу протеолитической активности (Ед., TEHB35,5o) принимают такое количество фермента, которое при стандартных условиях катализирует гидролиз гемоглобина за 1 мин при (35,5 ± 0,5) °С до неосаждаемых трихлоруксусной кислотой продуктов гидролиза в количестве, соответствующем 1 миллиэквиваленту (мэкв) тирозина (1 ммоль тирозина).

*Испытуемый раствор.* Содержимое 5 флаконов (около 250 мг препарата) количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в хлористоводородной кислоты растворе 0,0025 М и доводят объем раствора тем же растворителем до метки. В мерную колбу вместимостью 200 мл помещают 1 мл полученного раствора и доводят объем раствора хлористоводородной кислоты раствором 0,0025 М до метки.

 *Раствор стандартного образца тирозина.* Около 14,495 мг (точная навеска) стандартного образца L-тирозина помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 40 мл хлористоводородной кислоты раствора 0,2 М и доводят объем раствора тем же растворителем до метки. В мерную колбу вместимостью 50 мл переносят 10 мл полученного раствора и доводят объем раствора хлористоводородной кислоты раствором 0,2 М до метки (0,0008 мэкв тирозина/5 мл раствора).

*Раствор гемоглобина.* Около 2,2 г гемоглобина (точная навеска) растворяют в 7,8 мл воды до получения 22 % раствора. Раствор используют свежеприготовленным.

*Раствор субстрата.* Смешивают 8 мл натрия гидроксида раствора 1 М с 72 мл воды, затем добавляют 36 г мочевины и 10 мл раствора гемоглобина. Смесь выдерживают при (25 ± 2) оС в течение 30 мин, после чего добавляют мочевины раствор 4 г в 10 мл калия дигидрофосфата раствора 1 М. pH раствора субстрата должен быть от 7,5 до 8,0. Срок годности раствора субстрата при (5 ± 2) оС не более 10 сут.

Для определения протеолитической активности строят калибровочный график по тирозину.Для этого отбирают 0,25; 0,5; 1,0; 1,2; 1,5; 1,75; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 мл стандартного раствора тирозина и доводят объем каждого раствора хлористоводородной кислоты раствором 0,2 М до 5 мл. Получают растворы, содержащие в 5 мл по 0,00004; 0,00008; 0,00016; 0,000192; 0,00024; 0,00028; 0,00032; 0,00048; 0,00064; 0,0008 мэкв тирозина соответственно. После этого к содержимому каждой пробирки добавляют по 10 мл натрия гидроксида раствора 0,5 М и по 3 мл реактива Фолина-Чокальтеу разведённого. Растворы перемешивают, выдерживают в течение 10 мин (точно по секундомеру) и измеряют их оптическую плотность при 630 нм в кюветах с толщиной слоя 1 см. В качестве раствора сравнения используют хлористоводородной кислоты раствор 0,2 М. По средним из трех измерений показателям оптической плотности строят калибровочный график, откладывая на оси абсцисс количество тирозина в мэкв в пробе, а по оси ординат – соответствующие оптические плотности.

При проведении испытаний в контрольную и две опытные пробирки вносят по 5 мл раствора субстрата. В контрольную пробирку добавляют 10 мл трихлоруксусной кислоты раствора 5 % и 1 мл испытуемого раствора, перемешивают. Все пробирки выдерживают при (35,5 ± 0,5) оС в течение 3 мин. К содержимому пробирок добавляют по 1 мл испытуемого раствора, перемешивают и термостатируют при (35,5 ± 0,5) оС в течение 10 мин (точно по секундомеру). Затем в каждую из пробирок добавляют по 10 мл трихлоруксусной кислоты раствора 5 %, выдерживают при (22 ± 3) оС в течение 30 мин и фильтруют. Фильтраты должны быть прозрачными.

В фильтратах опытных и контрольных проб содержание продуктов ферментолиза гемоглобина определяют спектрофотометрическим методом. Для этого к 5 мл фильтратов опытных и контрольных проб добавляют по 10 мл натрия гидроксида раствора 0,5 М и по 3 мл реактива Фолина-Чокальтеу разведённого. Растворы перемешивают, выдерживают в течение 10 мин (точно по секундомеру), после чего измеряют их оптическую плотность при 630 нм в кюветах с толщиной слоя 1 см.

Из величины оптической плотности опытных растворов вычитают величину оптической плотности контрольного раствора и по найденной оптической плотности находят по калибровочному графику содержание тирозина (мэкв) в опытных пробах.

Протеолитическую активность препарата (*Ap*), выражаемую в количестве тирозиновых единиц (Ед., TEHB35,5o) во флаконе, вычисляют по формуле:

$$Ap=\frac{t ∙16 ∙100 ∙200}{5∙1 ·5 · 10}, где$$

*t* – содержание тирозина в опытной пробе, мэкв;

*100, 200* – разведения, мл;

*5* – количество анализируемых флаконов;

*5, 1, 10* – объем растворов, взятых на анализ;

16 – объем реакционной смеси.

Протеолитическую активность препарата рассчитывают как среднее значение не менее, чем из трех определений.

# Белок. От 43 до 53 мг во флаконе. Содержимое флакона с препаратом (около 50 мг) растворяют в 2 мл воды, после чего 1 мл усредненной пробы (не менее, чем из трех флаконов) помещают в колбу Къельдаля. Дальнейшее определение проводят в соответствии с ОФС «Определение белка» (метод 7 /метод А, метод Къельдаля/).

**Удельная активность.** Должна составлять не менее 0,004 TEHB35,5o на 1 мг препарата. Удельную активность препарата определяют расчетным путем, используя данные разделов «Количественное определение. Протеолитическая активность» и «Однородность массы».

Удельную активность препарата (*As*) во флаконе вычисляют по формуле:

$$As=\frac{Ap}{m} , где$$

*Ap* – протеолитическая активность препарата во флаконе, Ед.(TEHB35,5o).

*m* – средняя масса препарата во флаконе, мг.

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