**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

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

**Химотрипсин, лиофилизат ФС**

**для приготовления раствора**

**для инъекций для местного**

**и наружного применения**

***Chymotrypsin lyophilisate pro***

***praeparatione solution injections,***

***loci et externum uti* Взамен ФС 42 – 628-97**

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

 Настоящая фармакопейная статья распространяется на Химотрипсин, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций для местного и наружного применения, фермент протеолитического действия, получаемый по непрерывной технологии из поджелудочной железы крупного рогатого скота, с использованием сырья из хозяйств от животных, у которых отсутствуют заболевания различной этиологии, патогенные для человека.

 Препарат должен соответствовать ОФС «Лиофилизат» и ниже -приведенным требованиям.

**Описание.** Лиофилизированная пористая масса в виде таблетки, комоч­ков или блестящих чешуек белого цвета.

**Подлинность**

Должен обладать способностью вступать в реакцию со специфичным для химотрипсина синтетическим субстратом. Определение проводят по разделу «Определение протеолитической активности».

Метод спектрофотометрический

 *Испытуемый раствор*. Содержимое 2 флаконов переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Измеряют УФ – спектр поглощения раствора в диапазоне длин волн от 240 до 300 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Максимум поглощения раствора должен иметь максимум поглощения при длине волны (280 ± 2) нм и минимум при длине волны (249 ± 2) нм.

*Створаживащая активность*

 Определение проводят в водяном термостате с прозрачными стенками из стекла или оргстекла.

12 мг препарата (точная навеска) растворяют в 4 мл 0,1 М ацетатного

буферного раствора (pH 5,6). В 3 пробирки вносят по 3 мл раствора молока и про­гревают в течение 15 мин при температуре (35,5±0,5) °С. Затем в 2 пробирки (последова­тельно) добавляют по 0,5 мл раствора испытуемого препарата, взбалтывают и отмечают время по секундомеру. Наблюдение проводят в проходящем свете, не вынимая пробирок из термостата. Конец реакции отмечают по появлению пер­вых крупинок казеина. В контрольную пробу (3-я пробирка) к молоку добавля­ют 0,5 мл ацетатного буферного раствора (pH 5,6) и выдерживают в термостате 60 мин по секундомеру. Молоко не должно свертываться.

Створаживающая активность выражается временем, прошедшим с мо­мента добавления фермента до появления первых признаков створаживаниямолока. Время створаживания для химотрипсина должно быть не более 25 сек.

 *Приготовление раствора молока.* Натуральное свежее коровье молоко центрифугиру­ют 30 мин при 7000 - 8000 об/мин, удаляют жир и лиофильно высушивают. Хранят в банке с притертой крышкой в темном, прохладном месте в течение 6 мес.

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

 *Приготовление 1 М ацетатного буферного раствора* (pH 5.6)*.* 5,8 мл уксусной кислоты помещают в мер­ную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора до метки и перемешивают.

В мерной колбе вместимостью 100 мл, растворяют 13,6 г натрия ацетата, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Смешивают полученные растворы в соотношении 5,5:44,5. Срок хранения раствора 1 мес.

 **Время растворения**. Не более 1 мин. К содержимому флакона приливают 2 мл натрия хлорида раствора 0,9 %. Содержимое флакона должно полностью раствориться.

 Однородность массы. Должен соответствовать требованиями ОФС «Однородность массы дозированных лекарственных форм».

 **Прозрачность.** Должен быть прозрачным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей». Перед определением 0,02 г препарата растворяют в 10 мл воды (0,2 % раствор).

**Цветность**. 0,2 % раствор, приготовленный при испытании на прозрачность, дол­жен быть бесцветным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей».

 **pH**. От 4,5 до 5,5. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС«Ионометрия» в 0,2 % растворе препарата, приготовленный, как указано в разделе «Прозрачность».

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

 **Сульфаты.** Должен соответствовать требованиям ОФС «Сульфаты» метод 1. Предварительно перед определением 0,02 г препарата растворяют в 10 мл воды (0,2 % раствор).

Соли аммония. Должен соответствовать требованиям ОФС «Аммоний» Предварительно перед определением 0,02 г препарата растворяют в 10 мл воды (0,2 % раствор).

**Потеря в массе при высушивании.** Не более 10 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании».

**Остаточные органические растворители.** Определение проводят методом газожидкостной хроматографии.

*Приготовление растворов*

*Раствор внутреннего стандарта.* В мерную колбу с притертой пробкой вместимостью 100 мл помещают, 0,5 г (точная навеска) пропанола доводят объем раствора до метки и перемешивают. Раствор хранят при температуре от 15 до 25 ºС в течение 3 мес.

*Испытуемый раствор.* Около 0,1 г (точная навеска) препарата растворяют в 1,8 мл воды, добавляют 0,2 мл раствора внутреннего стандарта и перемешивают.

*Стандартный раствор.* В мерную колбу с притертой пробкой вместимостью 100 мл помещают 0,5 г (точная навеска) ацетона и 0,5 г (точная навеска) этанола, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают (5 мг/мл). Раствор хранят при температуре от 15 до 25 ºС в течение 3 мес.

В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 1 мл стандартного раствора (5 мг/мл), прибавляют 2,5 мл раствора внутреннего стандарта, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают (0,2 мг/мл). Раствор используют свежеприготовленным.

Хроматографические условия

Колонка: капиллярная кварцевая 30 х 0, 32 мм, 5 мкм, допускается

 использование колонки, удовлетворяющей требованиям

 пригодности хроматографической системы;

Газ-носитель: азот, 1 мл/мин, деление потока 1:30;

Температура колонки: 60 ºС;

Температура испарителя: 220 ºС;

Темпертура детектора: 250 ºС;

Объем пробы: 1 мкл;

Детектор: пламенно-ионизационный,

 скорость подачи воздуха – 200 мл/мин,

 скорость подачи водорода – 20 мл/мин.

 Хроматографируют стандартный раствор не менее 5 раз. Чувствительность системы устанавливают таким образом, чтобы высота пика ацетона была не менее 50 % шкалы записывающего устройства.

Порядок выхода пиков: ацетон;

 этанол;

 пропанол.

 Результаты анализа считаются достоверными, если выполняются следующие требования теста «Проверка пригодности хроматографической системы»:

 - степень разделения пиков пропанола и ацетона; пропанола и этанола; этанола и ацетона на хроматограмме стандартного раствора должна быть не менее 2;

 - эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику ацетона на хроматограмме стандартного раствора, должна быть 10000 теоретических тарелок;

 - относительное стандартное отклонение, рассчитанное по пику ацетона, не должно превышать 10 %.

 Стандартный и испытуемый растворы хроматографируют поочередно, получая не менее 5 хроматограмм.

 Содержание ацетона/этанола (Х) в процентах вычисляют по формуле:

 X= $\frac{B∙mo∙2∙100}{Bo∙100∙25∙m}$ = $\frac{B∙mo}{Bo∙m∙25}$ ,

где: *B* – среднее значение отношений площадей пиков ацетона/этанола к площадям пиков пропанола из хроматограмм испытуемого раствора;

 *Во* -среднее значение отношений площадей пиков ацетона/этанола к площадям пиков пропанола из хроматограмм стандартного раствора;

 *m* –препарата, г;

 *mo  -* масса навескистандартного образцаацетона/этанола, г;

2, 25, 100 - разведение препарата, мл.

Содержание ацетона в препарате должно быть не более 0,05 %. Содержание этанола в препарате должно быть не более 0,05 %.

**Пирогенность**. Должен быть апирогенным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность». Тест-доза 1 мг препарата в 1 мл натрия хлорида стерильного для инъекций раствора 0,9 **%** на 1 кг массы кролика.

**Аномальная токсичность.** Должен быть нетоксичным. Тест-доза 1 мг препарата в 0,5 мл натрия хлорида раствора для инъекций 0,9 % на мышь, внутривенно. Скорость введения – 0,1 мл/с, период наблюдения – 48 ч. Определение проводят в соответствовать ОФС «Аномальная токсичность».

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

**Количественное определение**

***Протеолитическая активность.***

*Метод спектрофотометрический*

Метод основан на определении скорости гидролиза N - бензоил – L – тирозина этилового эфира (БТЭЭ) и высвобождения - N - бензоил – L – тирозина под действием химотрипсина.

Протеолитическую активность выражают в бензоилтирозиновых единицах (БТЕ). Препарат имеет активность в 1 бензоилтирозиновую единицу, если при воздействии его на субстрат (БТЭЭ) при температуре 25 ºС и рН 7,8 в течение 1 мин гидролизуется 1 мкмоль субстрата с образованием 1 мкмоль N - бензоил – L – тирозина.

*Приготовление растворов*

*Приготовление испытуемого образца (1,0 мг/мл)*. Около 50 мг (точная навеска) химотрипсина помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 30 мл 0,001 М раствора хлористоводородной кислоты, перемешивают до полного растворения, доводят объем раствора до метки тем же растворителем и вновь перемешивают.

В другую мерную колбу вместимостью 50 мл переносят 1,0 мл испытуемого раствора (1,0 мг/мл), доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают (20 мкг/мл). Растворы используют свежеприготовленные.

*Приготовление раствора субстрата*.

15 мг БТЭЭ растворяют в 45 мл 50 % раствора спирта и перемешивают. Раствор хранят при температуре от 15 до 25 º С в темном месте в течение 3 мес.

*Приготовление 0,08 М трис-НCL буферного раствора рН 7,8.* 0,97 г трис

( гидроксиметил) аминометана и 2,19 г кальция хлорида гексагидрат (СаСL2 ∙ 6 Н2О) растворяют в 90 мл воды, устанавливают рН раствора 7,8 с помощью 1 М раствора хлористоводородной кислоты, переносят раствор в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Гидролиз БТЭЭ определяют по увеличению поглощения при длине волны 256 нм. В 2 кюветы размером 10 мм вносят по 1,5 мл буферного раствора и 1,4 мл раствора субстрата. В кювету сравнения вносят 0,1 мл 0,001 М раствор хлористоводородной кислоты и перемешивают.

В другую кювету вносят 0,1 мл испытуемого образца (20 мкг/мл), включают секундомер, перемешивают и замеряют оптическую плотность через каждые 30 сек в течение 5 мин от начала реакции. В течение указанного времени оптическая плотность должна увеличиваться практически линейно.

Вычисляют изменение оптической плотности в мин (∆А/мин) по формуле:

 ∆А/мин = $\frac{А5-А1}{4}$ ,

 где: А5 – оптическая плотность в испытуемом образце спустя 5 мин от начала реакции;

 А1 - оптическая плотность в испытуемом образце спустя 1 мин от начала реакции;

 4 – время между измерениями, мин.

 Протеолитическую активность химотрипсина в 1мг препарата в бензоилтирозиновых единицах (Х) вычисляют по формуле:

 Х = $\frac{∆А/мин∙3∙50 ∙50}{0,964∙а∙0,1 }= \frac{∆А/мин∙∙75000}{0,964∙а}$,

 где: а – навеска препарата, мг;

 ∆А/мин – среднее изменение оптической плотности в мин;

0,964 – коэффициент микромолярной экстинкции N- бензоил – L – тирозина;

 3 – объем реакционной смеси, мл;

50 ∙ 50 – коэффициенты разведения;

0,1 - объем испытуемого образца, мл.

Протеолитическая активность химотрипсина должна быть не менее 40 БТЕ/мг препарата.

***Общий белок***

*Метод спектрофотометрический*

 Содержимое пяти флаконов препарата количественно переносят с помощью воды в мерную колбу вместимостью 250 мл, доводят объем раствора до метки тем же растворителем и перемешивают. Проводят измерение оптической плотности на спектро­фотометре в кювете с толщиной слоя 10 мм при длине волны 280 нм. В качестве раствора сравнения используют воду. Концентрацию бел­ка находят по калибровочному графику. Количество белка (Х) во флаконе в мг вычисляют по формуле:

 Х = $\frac{С ∙250}{5}$,

 где: С – концентрация белка, найденная по калибровочному графику, мг/мл;

 250 разведение, мл;

 5 – количество флаконов, взятых на анализ, шт.

Содержание белка во флаконе должно быть от 8,0 до 11,0 мг.

*Калибровочный график*

В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 25,0 мг химотрипсина, растворяют в 10 мл воды и доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают. 1 мл полученного раствора со­держит 0,5 мг\мл химотрипсина.

 Для построения калибровочного графика готовят следующие разве­дения стандартного раствора:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| № п/п | Стандартный раствор химотрипсина, мл  | Вода, мл | Концентрация химотрипсина, мг/мл |
| 1 | 1,00 | 9,00 | 0,05 |
| 2 | 2,00 | 8,00 | 0,10 |
| 3 | 3,00 | 7,00 | 0,15 |
| 4 | 4,00 | 6,00 | 0,20 |
| 5 | 5,00 | 5,00 | 0,25 |
| 6 | 6,00 | 4,00 | 0,30 |
| 7 | 7,00 | 3,00 | 0,35 |
| 8 | 8,00 | 2,00 | 0,40 |
| 9 | 9,00 | 1,00 | 0,45 |
| 10 | 10,00 | - | 0,50 |

Оптическую плотность растворов измеряют на спектрофотометре при длине волны 280 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют воду. Строят калибровочный график, откладывая на оси абсцисс концентрацию белка в пробе в мг/мл, а на оси ординат - величину оптической плотности.

Калибровочный график строится при каждом определении.

Хранение. В защищенном от света месте при температуре не выше 25 ºС в соответствии с ОФС «Хранение лекарственных средств».