Содержание

Список сокращений…….3

Введение……...4

1. Характеристика ферментов поджелудочной железы……...6

1.1. Поджелудочная железа крупного рогатого скота и ее ферментативная функция…….……..6

1.2. Строение, свойства и механизм действия фермента трипсин……..11

2. Выделение протеолитических ферментов из поджелудочной железы крупного рогатого скота…….. ……16

3. Технология производства препарата трипсин ООО «Самсон-Мед»……18

4. Методика определения качества готового препарата трипсин……...35

5. Экологические и экономические аспекты производственного процесса……..39

6. Техника безопасности и охрана труда…….42

Выводы……...46

Заключение…….48

Список литературы……50

Приложения……...52

Список сокращений

КФ - классификация ферментов

ЛС - лекарственные средства

ПЕ - протеолитическая единица

ГФ - государственная фармакопея

ТП - технологический процесс

ВО - вспомогательные операции

ПО - переработка отходов

БАВ - биологически активные вещества

РНК-азы- рибонуклеаза

Кп - карбоксипептидаза А, Б

БАПНА- N-альфа-бензоил-DL-аргинин-4-нитроанилин гидрохлорид

ИЭТ – изоэлектрическая точка

Lys- лизин

Pro- пролин

Arg- аргинин

Glu – глутаминовая кислота

кДа- дальтон

Введение

При жизни животных некоторые органы способны накапливать биологически активные вещества. В мясной промышленности в процессе переработки животноводческого сырья получаются отходы, которые являются вторичным сырьем и используются при производстве ферментных препаратов.

Ферменты – это специфические катализаторы белковой природы, вырабатываемые клетками и тканями организмов. Они способны во много раз ускорять течение химических и биохимических реакций, не входя в состав конечных продуктов. Практические применения ферментов основаны на их высокой каталитической активности и более высокой по сравнению с небиологическими каталитическими системами субстратной специфичностью.

Производство ферментных препаратов, получаемых из органов животных, является одним из лидирующих направлений современной биотехнологии и относится к отраслям, объем продукции, которых постоянно растет, а сфера применения расширяется. Рост масштабов производства в данной отрасли ставит вопрос о переработки образующихся отходов мясокомбинатов, одним из которых является поджелудочная железа крупного рогатого скота. Поджелудочная железа крупного рогатого скота является ценным сырьем для производства ферментных препаратов, поскольку содержит протеолитические ферменты, среди которых наибольшее практическое значение имеют: рибонуклеаза, химотрипсин, трипсин, используемые в медицинской, фармацевтической и пищевой промышленности. Быстрое развитие связано с тем, что ферменты являются быстродействующими, нетоксичными биокатализаторами белкового происхождения, которые широко распространены в природе, без них невозможно осуществление многих биохимических процессов и жизнь в целом [10].

Протеолитический фермент трипсин, полученный из поджелудочной железы крупного рогатого скота, обладает выраженным противовоспалительным и противоотечным действием. Препарат трипсин эффективен при лечении гнойно-воспалительных процессов в хирургии различной локализации и этиологии, в офтальмологии расщепляет некротизированные ткани, способствует быстрому очищению раневых поверхностей. Кроме того, препарат трипсин повышает эффективность антибактериальной терапии за счет облегчения проникновения антибиотиков в ткани, обеспечивая их высокую концентрацию в очагах воспаления. Спектр применения трипсина может быть значительно расширен после тщательного изучения механизмов действия на функции различных органов и систем организма при патологических состояниях [11, 13].

Целью работы является: изучить технологические стадии производства протеолитического препарата Трипсин на основании технологического регламента на комплексное производство ферментных препаратов.

Задачи:

- изучить ферментный комплекс поджелудочной железы крупного рогатого скота.
- изучить строение и свойства фермента трипсин.
- освоить закономерности стадий извлечения поджелудочной железы из крупного рогатого скота, установить последовательности её обработки, консервирование.
- проанализировать протеолитическую активность Трипсина.

Объект и предмет исследований: Объектом исследований является поджелудочная железа крупного рогатого скота. Предметом является – фермент трипсин.

1. Характеристика ферментов поджелудочной железы

1.1. Поджелудочная железа крупного рогатого скота и ее ферментативная функция

Поджелудочная железа крупного рогатого скота (Pancreas) (рис 1.1.) – орган с двойной секрецией - внешней и внутренней. Внешнесекреторная часть поджелудочной железы вырабатывает панкреатический (поджелудочный) сок, принимающий участие в расщеплении белков, жиров и углеводов корма; внутрисекреторная часть железы продуцирует гормоны инсулин и глюкагон, регулирующие углеводный обмен, и гормон липокаин, принимающий участие в регуляции жирового обмена [21].

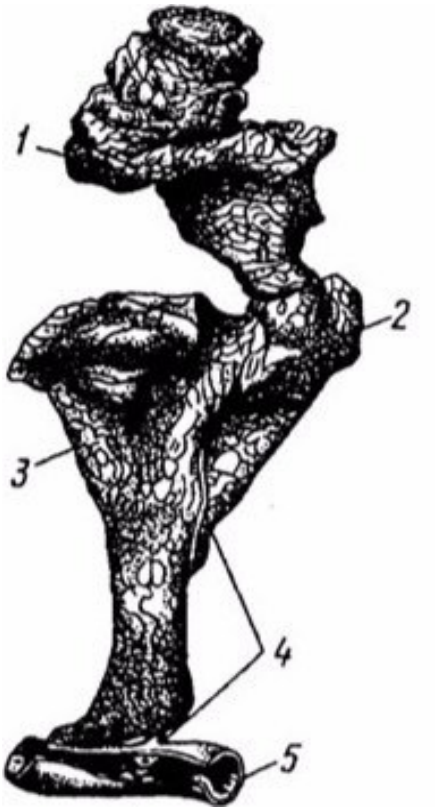


Рис.1.1. Поджелудочная железа крупного рогатого скота

1- левая доля, 2- тело, 3- правая доля , 4 выводной проток,

5- двенадцатиперстная кишка.

У крупного рогатого скота поджелудочная железа желто-бурого или розового цвета, в ней различают левую долю, тело и правую долю. Тело и правая доля поджелудочной железы лежат вдоль двенадцатиперстной кишки. Левая доля направлена перпендикулярно к ним и прилегает к рубцу.

Выводной проток открывается в двенадцатиперстную кишку обособленно от желчного протока [22, 18].

Гистололическое строение. Поджелудочная железа — компактный орган, сложная застенная альвеолярная железа (рис.1.2). Сверху покрыта серозной оболочкой. Соединительнотканная строма образует тонкую капсулу, от которой отходят междольковые прослойки соединительной ткани. Внутридольковые прослойки из рыхлой соединительной ткани развиты слабо. В строме проходят сосуды и нервы, имеются мелкие вегетативные ганглии (скопления нервных клеток) и нервные окончания.

Экзокринная паренхима образована эпителием энтодермального происхождения и состоит из концевых отделов и выводных протоков. Концевые отделы имеют форму альвеол, образованы однослойным призматическим эпителием. Обычно в самый мелкий выводной проток, который называется вставочным протоком, открывается несколько альвеол. Такая структура называется ацинусом. Экзокринная часть железы, состоящая из ацинусов, носит название ацинозной паренхимы [4].

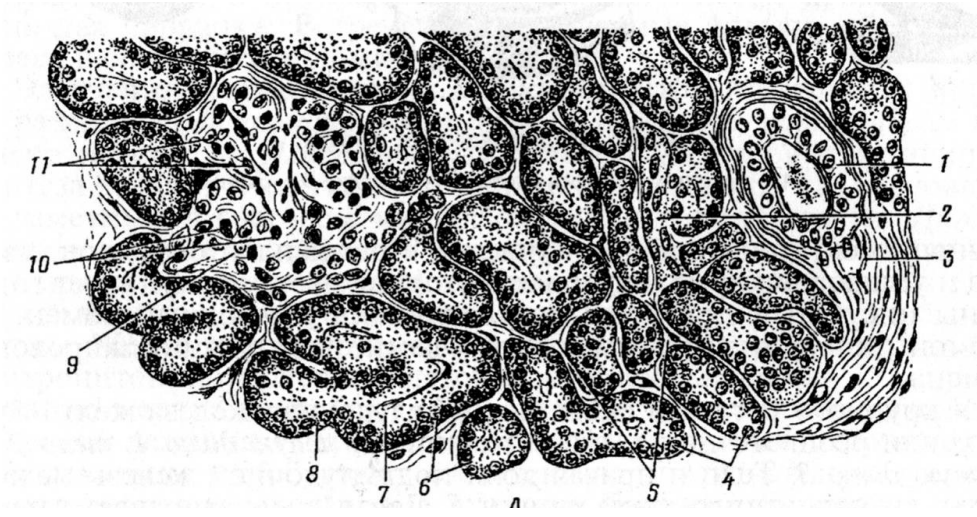


Рис.1.2. Гистологическое строение участка дольки железы

1- междольковые выводные протоки, 2-вставочный проток, 3- междольковая соединительная ткань, 4- альвеола, 5- внутридольковые прослойки, 6-

ацинозная клетка, 7- зимогенная и 8- базофильная зоны, 9- панкреатический островок (Лангерганса), 10- В-клетка, 11- А-клетка.

Ацинозная клетка имеет четко выраженную апикобазальную дифференцировку. Ее базальная, более расширенная часть заполнена массой плоских мешочков гранулярной цитоплазматической сети, воспринимает основные красители, за что называется базофильной, или гомогенной, зоной. Круглое ядро сдвинуто к базальной части клетки. Над ним расположен комплекс Гольджи. В апикальном полюсе клетки накапливаются крупные округлые гранулы секрета — зимоген, в который входят разнообразные ферменты в неактивной форме. Гранулы окрашиваются кислыми красителями, за что эта часть клетки названа оксифильной, или зимогенной, зоной. Секрет выделяется через апикальный полюс мерокринным способом и попадает в систему выводных протоков [4].

Выводной проток наименьшего диаметра назван вставочным, так как вдавливается на разную глубину в альвеолы. В результате клетки его стенки оказываются как бы вставленными в центр ацинуса и потому называются центроацинозными. На срезах их удлиненные светлые ядра можно видеть лежащими внутри альвеол. Диаметр вставочных протоков меньше альвеол. Их стенка образована уплощенными клетками со светлой цитоплазмой, бедной органеллами. Вставочные протоки объединяются сначала в мелкие внутридольковые выводные протоки, затем в более крупные внутридольковые протоки и, наконец, в междольковые выводные протоки. Последние образуют общий выводной проток поджелудочной железы, идущий к двенадцатиперстной кишке. По мере увеличения диаметра протока высота его эпителия увеличивается, а окружающие их прослойки соединительной ткани утолщаются и уплотняются.

Эндокринная паренхима составляет около 3% массы поджелудочной железы, представлена панкреатическими островками Лангерганса. Они имеют неправильно-округлую, эллипсоидную или отростчатую форму,

хорошо снабжаются кровью. В островке обычно можно видеть несколько капилляров. Состоят островки из клеток нескольких типов, вырабатывающих разные гормоны. Друг от друга отличаются только при специальной обработке. Островковые клетки мельче ацинозных и светлее. Все они содержат мелкие митохондрии, хорошо развитый комплекс Гольджи и секреторные гранулы, характерные для каждого вида клеток.

Самые многочисленные В - клетки. Специальными красителями эти клетки окрашиваются базофильно. Их зернистость растворима в спирте и нерастворима в воде. Вырабатываемый ими инсулин способствует утилизации глюкозы тканями и превращению ее в гликоген, чем снижает уровень глюкозы в крови. *А*-клетки при специальной обработке окрашиваются оксифильно, растворимы в воде и нерастворимы в спирте. Эти клетки вырабатывают глюкагон — гормон, противоположный по действию инсулину. Он способствует расщеплению гликогена до глюкозы и выведению ее в кровь. Среди остальных клеток различают еще несколько типов, вырабатывающих гормоны, по-видимому, регулирующие белковый и липидный обмены [4].

Секрет поджелудочной железы содержит сложный набор гидролитических ферментов действующих на различные классы веществ – белки, жиры, нуклеиновые кислоты, углеводы. Некоторые ферменты (нуклеазы и амилазы) секретируются в поджелудочный сок сразу в активном состоянии, а другие ферменты - протеазы, фосфолипаза синтезируются тканью железы в виде неактивных предшественников–зимогенов и превращаются в активные ферменты уже в самом поджелудочном соке [14]. Известно, что поджелудочная железа крупного рогатого скота содержит целый ряд ферментов различной субстратной спецификации, в частности трипсин КФ (3.4.21.4), химотрипсин (3.1.1.3), карбоксиполипептидазы (КФ 3.4.16.1), рибонуклеазы.

Трипсин расщепляет белки до аминокислот и выделяется в виде неактивного трипсиногена, который активируется ферментом кишечного

сока энтерокиназой. Химотрипсин расщепляет белки и полипептиды до аминокислот и выделяется в форме неактивного химотрипсиногена; активируется трипсином. Карбоксипептидаза действует на полипептиды, отщепляя от них аминокислоты. Рибонуклеаза – деполимеризует РНК до кислотно-растворимых моно - и олигопептидов.

Химотрипсин — протеолитический фермент, секретируемый поджелудочной железой в тонкий кишечник в виде неактивного предшественника – химотрипсиногена. Химотрипсин был исследован более детально, чем другие очищенные ферменты. Относительная молекулярная масса химотрипсина составляет 23000 Да, pH-оптимум 7,0-9,0, температурный оптимум около 50°С, ИЭТ молекулы химотрипсина составляет pH 8,1-8,2. Подобно трипсину химотрипсин осуществляет гидролиз субстратов сложных эфиров, который идет через образование ковалентного промежуточного соединения. Наряду с пептидами фермент гидролизует амиды и эфиры, при этом он предпочтительно расщепляет связи, образованные остатками ароматических аминокислот: тирозином, триптофаном, фенилаланином [23].

Карбоксипептидазы (А, Б) – протеолитеческие ферменты, экзопептидазы.

Карбоксипептидазы А и Б синтезируются в поджелудочной железе в виде проферментов прокарбоксипептидазы А и прокарбоксипептидазы В, в таком виде, в составе панкреатического сока ферменты попадают в двенадцатиперстную кишку, где под воздействием трипсина прокарбоксипептидазы А и Б превращаются в Карбоксипептидаза А и Б.

Карбоксипептаза А (КФ 3.4.17.1) состоит из 307 аминокислотных остатков, имеет молекулярную массу около 34 400 Да и отщепляет от пептидов все С-аминокислотные остатки, за исключением аргинина, лизина, пролина и гидроксипролина, катализируя, в основном, ароматические и алифатические аминокислоты. Карбоксипептидаза Б (КФ 3.4.17.2) состоит из 300 аминокислотных остатков, имеет молекулярную массу около 34000 Да и

отщепляет только С-концевые остатки аргинина и лизина, катализируя основные аминокислоты [23].

РНК- аза – фермент - нуклеаза, выделяемый из поджелудочной железы крупного рогатого скота, катализирующие деградацию РНК. Это белок с молекулярной массой 14 кДа, состоит из 124 аминокислотных остатков, соединенных в одну полипептидную цепь, оптимум рН 7,4-7,5, ИЭТ - 9,6. Наличие четырех дисульфидных связей скрепляет макромолекулу фермента и придает ей устойчивость. Установлена трехмерная структура рибонуклеазы и осуществлен ее химический синтез. Процесс разрушения РНК панкреатической рибонуклеазой протекает в несколько стадий. Вначале фермент расщепляет межнуклеотидные связи неспирализованных участков полинуклеотидной цепи с образованием олигонуклеотидов. При этом гидролизуются связи между фосфором и углеродом (C_5) рибозного остатка с последующим трансфосфорилированием внутри молекулы и образованием циклических фосфорных производных. Далее рибонуклеаза гидролизует циклические фосфодиэфирные связи с образованием фосфатных производных. Эта реакция протекает медленно. Панкреатическая рибонуклеаза гидролизует межнуклеотидные связи избирательно в зависимости от природы азотистых оснований, входящих в нуклеотиды. Фермент предпочтительнее расщепляет фосфоэфирные связи пиримидиновых нуклеотидов в молекуле РНК. Рибонуклеаза с большой скоростью гидролизует фосфодиэфирные связи в нуклеотидах, содержащих в качестве азотистого основания цитозин [24].

1.2. Строение, свойства и механизм действия фермента трипсин

Трипсин (trypsinum) – ферментный препарат протеолитического действия, получаемый из поджелудочной железы крупного рогатого скота. Впервые кристаллический бычий трипсин (КФ 3.4.4.4) был получен Дж Х. Нортропом и М. Кунитцем в 1931 году [14]. При медленном нагревании до 25°С холодного насыщенного раствора белка в сульфате аммония выделялись квадратные пластинки кристаллов трипсина (рис 1.3.) [14].

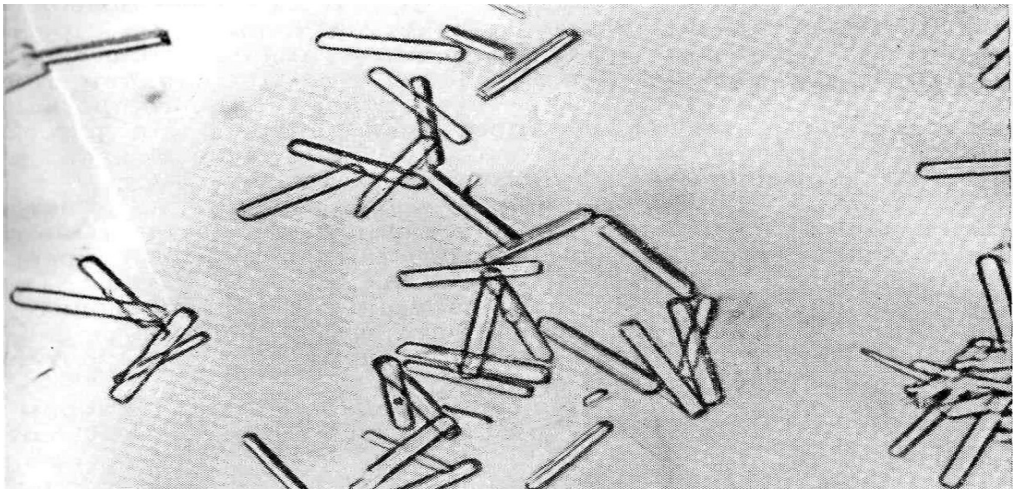


Рис 1.3. Кристаллы бычьего трипсина (увеличение 500)

Строение и свойства трипсина. Трипсин содержится в поджелудочной железе в виде предшественника фермента — зимогена, называемого трипсиногеном. Молекулярная масса трипсиногена 23,0÷23,8 кДа. Под действием энтерокиназы (К.Ф. 3.4.21.9) (протеолитическпй фермент, входящий в кишечный секрет) в кислой среде трипсиноген превращается в трипсин за счёт отщепления полипептида с шестью аминокислотными остатками с N-концевой части пептидной цепи. Трипсиноген может активироваться и трипсином. Процесс превращения трипсиногена в трипсин стимулируется ионами Ca^{2+} при pH среды менее 4,0. Процесс этот в определенных условиях может стать автокаталитическим. Чтобы иметь возможность из активированного трипсиногена получить кристаллический трипсин, важно не допустить образования неактивного белка и активных фрагментов трипсина, которые имеют меньшую удельную активность, чем истинный трипсин. Для обеспечения нормального течения процесса превращения трипсиногена в трипсин необходимо предотвратить автолитические процессы в сырье в период хранения, обеспечить отсутствие химотрипсина, и соблюдать условия кристаллизации трипсина [5].

Трипсины от разных видов животных имеют близкий качественный и количественный набор аминокислот и форму кристаллов. Молекулы трипсина и трипсиногена имеют глобулярное строение. Бычий трипсин

представляет собой белки с сильно выраженными основными свойствами, ИЭТ около pH 10,5, оптимум каталитической активности наблюдается в интервале pH 7,0-9,0, при температуре около 50°С. Относительная молекулярная масса бычьего трипсина 23,8 кДа и состоит из 223 аминокислотных остатков, образующих одну полипептидную цепь, содержащую шесть дисульфидных связей. Последовательность аминокислотных остатков фермента полностью расшифрована [3]. С помощью рентгеноструктурного анализа установлена третичная структура трипсина. Он относится к группе сериновых протеиназ и содержит в активном центре остатки серина и гистидина. Важным свойством молекул трипсина в растворе является их способность к ассоциации, в которой активный центр не участвует [16].

На ферментативную активность фермента трипсин и конформацию фермента и его зимогена влияют различные внешние факторы. Активность трипсина подавляется фосфорорганическими соединениями, некоторыми металлами, а также рядом высокомолекулярных белковых веществ - ингибиторов трипсина, содержащихся в тканях животных. Ионы Ca^{2+}, Mg^{2+}, Ba^{2+}, Sr^{2+}, Mn^{2+} повышают гидролитическую активность трипсина [8].

Трипсин способен превращать в активные ферменты все проферменты поджелудочной железы (трипсиноген, химотрипсиноген, прокарбоксипептидазу), а также фосфолипазу, и в связи с этим занимает ключевое положение в системе пищеварительных ферментов [16].

Биосинтез фермента трипсин. Трипсиноген это неактивное состояние трипсина. При попадании трипсиногена в двенадцатиперстную кишку, под действием желчи и фермента энтеропептидазы, который вырабатывают клетки слизистой оболочки кишечника (энтероциты). Фермент энтеропептидаза отщепляет с N - конца полипептидной цепи шесть аминокислотных остатков (Вал - $(Асп)_4$ - Лиз. В процессе отщепления гексапептида от предшественника - важное биологическое значение, так как

при этом происходит формирование активного центра и образование трехмерной структуры трипсина (схема 1.4.).



Схема 1.4. Активация трипсиногена в трипсин

Механизм действия трипсина. Трипсин катализирует гидролиз преимущественно пептидных связей в молекулах белков, где карбоксильная группа образована аминокислотами с положительно заряженной боковой цепью – аргинином и лизином. При физиологических значениях pH трипсин подвергается автолизу с потерей ферментативной активности [3]. Пептидные связи Lys-Pro и Arg-Pro устойчивы к гидролизу. Частичной устойчивостью к гидролизу трипсином обладают некоторые другие пептидные связи, например, в структуре Lys-Lys-X связь Lys-Lys или связи в пептидах Arg-Arg, Arg-Lys и Lys-Arg. «Скопление» основных аминокислот в определенных участках пептида обусловливает частичную устойчивость его к гидролизу. То же самое справедливо и для пептидных связей Lys-Glu и Arg-Glu [9]. Специфичность триптического гидролиза позволяет «управлять», биохимической реакцией внося те или иные изменения в структуру гидролизуемых соединений. Например, по мере аминоэтилирования свободных SH-групп увеличивается число NH_2-групп и, следовательно, увеличивается количество пептидных связей, чувствительных к трипсину, то есть в гидролизате оказывается больше триптических пептидов.

Новейшим методом обратимого блокирования ε-NH_2-групп считают реакции малеинирования и цитраконилирования. При необратимом

заблокировании NH_2-группы лизина, трипсин может гидролизовать только те пептидные связи, в которых участвует аргинин. В этом случае в гидролизате обнаруживаются крупные аргиниловые пептиды. При обратимом блокировании остатков лизина, например, путем трифторацетилирования, после выделения аргиниловых пептидов их можно деблокировать, а затем подвергнуть триптическому гидролизу; при этом будут расщепляться только пептидные связи лизина [9].

Амиды расщепляются трипсином быстрее, чем пептиды, а сложные эфиры — быстрее, чем амиды. На скорость гидролиза эфиров не влияет природа спиртовой группы. Даже такое простое соединение, как этиловый эфир лизина, быстро гидролизуется трипсином. Замещение аминогруппы в боковой цепи делает гидролиз невозможным, тогда как замещение α-аминогруппы, наоборот, благоприятствует гидролизу. В то же время, при удалении α-аминогруппы гидролиз оказывается невозможным.

Специфические требования трипсина могут быть удовлетворены даже если необходимые группы находятся на разных молекулах. В. Инагами и Дж. Мураки [9] исследовали влияние некоторых четвертичных катионов на катализируемый трипсином гидролиз пептидов. Все исследованные катионы оказались конкурентными ингибиторами гидролиза специфических субстратов, например, этилового эфира бензоил-L-аргинина. Однако гидролиз ацетилглицина ускорялся в 3,9 по 2 раза метиламином, этиламином и 1-н-пропиламином соответственно, но 1-н-бутиламин оказался инги-битором. При взаимодействии с соответствующим ионом происходит активация трипсина, при этом сродство к субстрату не изменяется. Положительно заряженная группа индуцирует активацию каталитического участка фермента подобно тому, как это осуществляют боковые группы аргинина или лизина у специфических субстратов.

2. Выделение протеолитических ферментов из поджелудочной железы крупного рогатого скота

Сырьем для производства ферментных препаратов служит ферментное сырье – поджелудочная железа (орган двойной секреции) крупного рогатого скота. Поджелудочную железу собирают только от здоровых животных после ветеринарного освидетельствования их перед убоем и ветеринарной экспертизы.

Важнейшее условие правильной организации сбора ферментного сырья - быстрое извлечение его из туши животного. Время с момента извлечения поджелудочной железы до замораживания не должно превышать 1,5 часа, иначе активность сырья резко снижается. Первичная обработка сырья предусматривает очистку (препарирование) от посторонних тканей, прирезей и оболочек. Перед этим поджелудочную железу сортируют, устраняют имеющиеся дефекты. Препарируют сырье раздельно по видам скота и видам желез в специальном помещении эндокринного отделения мясокомбината. Помещение должно иметь хорошее освещение, температуру воздуха не более 18°С. Не допускается попадание на обрабатываемое сырье прямых солнечных лучей. Стены должны быть покрыты масляной краской, пластиком или облицовочной плиткой [17].

Поджелудочную железу крупного рогатого скота сначала отделяют от селезенки, двенадцатиперстной кишки, брыжейки и печени вручную или с помощью ножниц, острого ножа. Делают это осторожно, чтобы не повредить паренхиму. После этого железу раскладывают на столе и от нее отделяют остатки соединительной ткани и жира, сосудов, лимфатических узлов [7].

Технология хранения ферментного сырья. Для сохранения целевых биологических свойств ферментного сырья его немедленно после сбора и очистки консервируют. Применяемые способы консервирования должны быть такими, чтобы свести к минимуму структурные и физико-химические изменения свойств сырья, полностью предотвратить развитие микробиологических процессов и в максимальной степени затормозить

биохимические процессы в тканях. Замораживание является наиболее распространенным методом консервирования, так как позволяет сохранить биологическую активность сырья. Для этого сырье замораживают в скороморозильных аппаратах и направляют в специальные морозильные камеры или в изотермический контейнер для транспортирования. В некоторых случаях применяют химическое консервирование этиловым спиртом, чистым ацетоном, формалином и поваренной солью. Замораживание ферментного сырья проводят от 40 до -50°С; иногда допускается замораживать при -20°С. Подготовленное и рассортированное сырье, предназначенное для замораживания, раскладывают в один или два слоя на противни из нержавеющей стали или алюминия. Длительность замораживания зависит от условий замораживания и величины желез. Ферментное сырье можно замораживать в морозильных аппаратах или в камерах, предназначенных для замораживания субпродуктов, при температуре не выше -20°С [7].

Активность эндокринно-ферментного сырья сохраняется при использовании аппаратов с иммерсионным или струйным распылением жидкого азота. Замороженное эндокринно-ферментное сырье упаковывают непосредственно в морозильной камере в деревянные ящики в количестве не более 30 кг или короба из гофрированного картона в количестве не более 10 кг. Ящики предварительно охлаждают и выстилают полиэтиленовой пленкой или пергаментом. Сырье в ящики укладывают плотно, не допуская излишних деформаций. Тару снаружи маркируют. Замороженное эндокринно-ферментное сырье хранят в камерах при температуре не выше -20°С в течение 4-6 месяцев. Перед отправкой на предприятия фармацевтической промышленности эндокринные железы подлежат ветеринарно-санитарной экспертизе. При наличии признаков гнилостного разложения или постороннего запаха, эндокринное сырье направляют для технической утилизации [7].

3. Технология производства препарата трипсин на ООО «Самсон-Мед»

Основное назначение трипсина - (trypsinum) в качестве ферментного препарата. Выпускают трипсин по ГФ X ст 703. Номер регистрационного удостоверения р.72.736.19/1на ООО «Самсон – Мед».

Трипсин представляет собой ферментный препарат протеолитического действия. Внешний вид - пористая масса или порошок белого со слегка желтоватым оттенком цвета, без запаха. Легко растворим в воде и изотоническом 0,9% растворе хлорида натрия. Стерилен, апирогенен, нетоксичен. Активность препарата определяют биохимическим методом по Ансону. 1 г препарата содержит не менее восьми тирозиновых единиц. Трипсин - обладает выраженными противовоспалительными и противоотечными свойствами, способен расщеплять омертвевшие участки тканей, фиброзные образования [7].

Для изготовления трипсина в качестве сырья берут поджелудочную железу крупного рогатого скота. Поджелудочные железы должны быть собраны раздельно от каждого вида скота и обработаны по технологической инструкции с соблюдений санитарных правил [1].

По органолептическим и физико-химическим показателям поджелудочные железы должны соответствовать требованиям ГОСТ 11285-93[1].

а) внешний вид - железы должны быть очищены от наружного жира и прирезей соединительной ткани, иметь цельную поверхность без повреждений, и заморожены поштучно или в виде пластин или блоков толщиной не более 5см.

б) цвет - от розового с желтоватым оттенком до розовато- красного.

в) температура внутри блока или отдельной железы при приемке, не выше -18˚ С.

Отбор и подготовка проб. Для проведения испытаний при замораживании поджелудочных желез поштучно берут не менее чем по 5 желез из каждого ящика, а при замораживании ПЖ в блоках из разных слоев каждого ящика,

отобранного в выборку, отбирают точечные пробы массой 180—200 г. Из точечных проб составляют объединенную пробу массой (1000±20) г, измельчают на мясорубке и тщательно перемешивают, не допуская поднятия температуры в измельченной пробе выше 4°С.

Определение внешнего вида и цвета. Внешний вид и цвет, замороженных поджелудочных желез определяют визуально при дневном свете. Целостность желез и наличие на них прорезей жировой и соединительной тканей определяют после частичного оттаивания взятых на анализ желез путем визуального осмотра.

Определение температуры. Термометр стеклянный жидкостной (не ртутный), вмонтированный в металлическую оправу, с диапазоном измерения от - 38 до 0С° с допускаемой погрешностью измерения ±1 ˚ С. В замороженной поштучно или в виде блоков (пластин) ПЖ делают отверстие и термометром измеряют температуру на глубине 2,0±0.5 см. Отверстие можно сделать коловоротом вручную. Сверло коловорота должно быть предварительно охлаждено до температуры не выше - 18°С [1].

Компания ООО «Самсон-Мед» российское фармацевтическое предприятие полного производственного цикла: от производства субстанций до выпуска готовых лекарственных форм. Продукция компании завоевала себе прочное место на потребительском рынке труда и пользуется стабильным спросом.

Наиболее перспективными, с точки зрения получения высококачественных белков, являются методы избирательной сорбции на микропористых носителях – сорбентах, не изменяющих лабильную структуру ферментов. В настоящее время на предприятии ООО «Самсон - Мед» внедрена и успешно применяется эффективная сорбционная технология с использованием ионообменных процессов на стадиях разделения и очистки ферментов. Использование сорбционной технологии не только повысило качество выпускаемых препаратов, но и значительно сократило время

технологического процесса, существенно снизило энергозатраты на производство единицы продукции [25].

Технологический процесс получения трипсина. В общем виде технология получения кристаллического трипсина на основе эндокринно-ферментного сырья животного происхождения основана на следующих операциях (прил. 4):

ТП.1.1. Приготовление экстракционной смеси.

ТП.1.2. Измельчение поджелудочной железы, первая экстракция.

ТП.1.3. вторая экстракция и разделительная фильтрация.

ТП.1.1.Приготовление экстракционной смеси. Для проведения экстракции используют 0,25н раствор серной кислоты. Соотношение объема экстракционной смеси к весу поджелудочной железы 2:1 (первая экстракция) и 1:1 (вторая экстракция). Для приготовления 0,25н раствора серной кислоты используют емкость.

Предварительно ее моют теплой водопроводной водой и ополаскивают дистиллированной водой. Затем в емкость заливают необходимое количество дистиллированной воды из сборника, добавляют туда расчетное количество серной кислоты предварительно разбавленной 1:1.

ТП.1.2 . Измельчение поджелудочной железы первая экстракция. 300 кг замороженной поджелудочной железы крупного рогатого скота, соответствующей требованиям ГОСТ 11285-93 [1], измельчают на измельчителе специальной конструкции. Измельченную поджелудочную железу собирают в емкости. Приготовленный раствор 0,25 н серной кислоты в количестве 600 мл из емкости с помощью вакуума перекачивают в реактор и охлаждают до температуры +12,+15, путем подачи рассола в рубашку реактора. Охлажденный раствор из реактора сливают в емкость для приема измельченной железы, оставив в реакторе необходимое количество серной кислоты для промывки линий в емкости. Загрузочный трубопровод промывают 0,25н раствором серной кислоты, сливая раствор в реактор. После загрузки всей железы в реактор начинают отсчет времени первой

экстракции. Первую экстракцию ведут 16-17 часов при температуре не выше +5°С. Перемешивание, экстракционной смеси проводят автоматически: первые 2 часа - непрерывно, а затем периодически - каждый час по 15 мин.

За один час до конца экстракции добавляют, при перемешивании, кристаллический сульфат аммония до степени насыщения 0,05 и 1% (к общему объему смеси) кизельгура. После высаливания смесь отстаивают 1-2 часа [20]. После отстаивания надосадочную жидкость сифонируют в реактор. Для подавления роста микрофлоры допускается введение кристаллического фенола в количестве 1 кг на 1000 л экстракционной смеси.

ТП.1.3. Вторая экстракция и разделительная фильтрация. Вторую экстракцию проводят 0,25н раствором серной кислоты в соотношении 1:1, то есть на 1 кг поджелудочной железы берут 1 л 0,25 н раствора серной кислоты. В промежуточной емкости готовят необходимое количество 0,25 н раствора серной кислоты, перекачивают его в реактор, охлаждают до температуры от+3 до +5°С подачей рассола в рубашку реактора и снова перекачивают в промежуточную емкость. К оставшейся в реакторе № 2 экстракционной смеси добавляют подготовленный 0,25 н раствор серной кислоты и проводят вторую экстракцию. Вторую экстракции ведут 1 час при температуре от +3 до +5°С при непрерывном перемешивании.

По окончании экстракции экстракционную смесь подают самотеком на центрифугу НОГШ – 325, где жмых отделяют от экстракта. Экстракт с помощью вакуума передают в реактор.

Жмых после центрифугирования собирают в бачки и передают на завод технических фабрикатов для переработки. Фильтрацию экстракта проводят на фильтровальных ваннах. Предварительно ванны тщательно моют теплой водопроводной водой, ополаскивают дистиллированной водой и застилают фильтровальной тканью. Экстракт из реактора перекачивают с помощью центробежного насоса в холодную камеру №1 на фильтрующие ванны.

Фильтрацию проводят при температуре не выше +7°С. По мере замедления процесса фильтрации, ткани меняют, собирая остатки непрофильтрованного

экстракта в сборник. Прозрачный фильтрат после фильтрации перекачивают с помощью вакуума в реактор для высаливания ДНК-азы. Температура фильтрата в реакторе должна быть не выше +5°С.

После окончания фильтрации трубопроводы и фильтровальные ванны промывают водопроводной водой. В технологическом журнале записывают объем фильтрата, его температуру, количество сульфата аммония.

ТП.1.4. Высаливание и отделение балластных белков. Измеряют общий объем экстрактов, полученных от первой и второй экстракции, его температуру (не выше +5°С). Высаливание балластных веществ, проводят кристаллическим сернокислым аммонием до степени насыщения 0,19. Для этого взвешивают необходимое количество сернокислого аммония и с помощью вакуума, небольшими порциями, при перемешивании, добавляют в экстракт. После высаливания, при необходимости для лучшего разделения фаз в экстракте, проводят смещение pH. Для этого, 25%-м раствором аммиака доводят сначала pH в экстракте до 8,6-9,0, а через 3-5 минут серной кислотой (разбавленной (1:1) до pH 2,7-3,0 (по универсальной индикаторной бумаге) [20].

Для получения кристаллических ферментов и рибонуклеазы, высаливание балластных веществ, проводят до степени насыщения 0,37.

ТП.1.5 Выделение ДНК-азы высаливанием. Отстаивание и фильтрация. Высаливание ДНК-азы из фильтрата проводят кристаллическим сернокислым аммонием. Для этого в реактор добавляют при перемешивании порциями кристаллический сульфат аммония для степени насыщения 0,4. Температура высоленного раствора поддерживают не выше +5°С. После высаливания с поверхности реакционной смеси осторожно снимают пену. Осадок седиментируется не менее 40 часов при температуре не выше +5°С, температура которая автоматически поддерживается подачей рассола в рубашку реактора. Если частично осадок выплывает, то поверхностный слой осторожно перемешивают. По истечении времени седиментации,

недосадочную жидкость сифонируют в реактор для производства химотрипсина, трипсина, РНК- азы и пантрипина.

Оставшуюся ферментную массу сливают самотеком на заранее смонтированный нутч-фильтр, где осадок отделяют, фильтрат направляют в реактор. Осадок ДНК-азы снимают с нутч- фильтра, взвешивают и хранят при температуре не выше +7°С.

По мере необходимости осадок ДНК-азы передают на участок химической очистки ферментов для дальнейшей обработки.

В технологическом журнале записывают число, объем фильтрата, температуру фильтрата, количество сернокислого аммония, время, вес осадка ДНК-азы. Далее фильтрат поступает на стадию ТП.2. Получение химотрипсиногена и аморфного трипсина [20].

ТП.2. Получение химотрипсиногена и аморфного трипсина.

ТП.2.1. Высаливание химотрипсиногена и трипсина из фильтрата. Фильтрат для производства химотрипсина и трипсина собирают в реактор. Измеряют объем фильтрата, а затем с помощью вакуума, небольшими порциями при перемешивании добавляют сульфат аммония до степени насыщения 0,7.

Температуру высоленного раствора поддерживают не выше +5°С.

После высаливания с поверхности реакционной массы осторожно снимают пену. Осадок седиментируется не менее 36 часов при температуре не выше +5°С, автоматически регулируя ее подачей рассола в рубашку реактора.

При частичном всплытии осадка поверхностный слой осторожно перемешивают. По истечении времени седиментации недостаточную жидкость сифонируют в реактор для производства рибонуклеазы. Оставшуюся ферментную массу сливают самотеком на нутч-фильтр, где осадок отделяют, а фильтрат направляют в реактор.

Осадок (первый высол) снимают с нутч-фильтра, взвешивают и хранят при температуре не выше +5°С. По мере надобности осадок передают на участок химической очистки ферментов для его дальнейшей обработки.

В технологическом журнале записывают число, объем фильтрата, температуру фильтрата, количество сернокислого аммония, время седиментации, вес осадка.

ТП.2.2.Растворение осадка и удаление балластных веществ. Осадок первого высола растворяют в емкости в трех объемах дистиллированной воды, охлажденной до +5°С.Фильтруют через слой марли, замеряют объем и высаливают охлажденным до +5-7°С насыщенным раствором сульфата аммония из расчета 587 мл насыщенного раствора сульфата аммония на 1 л раствора. Высаливание ведут при постоянном перемешивании. Для очистки раствора от слизистых и балластных веществ добавляют кизельгур из расчета 10-20 г/л. Раствор отстаивают 15-20 минут, а затем с помощью центробежного насоса передают на нутч-фильтр. Осадок отбрасывают, а фильтрат передают снова в емкость. Фильтрат может быть прозрачным или слегка опалесцирующим.

ТП.2.3. Высаливание химотрипсина и трипсина. Высаливание химотрипсиногена и трипсина проводят в емкости. Для этого измеряют объем фильтрата и постепенно, при перемешивании, тонкой струей добавляют охлажденный насыщенный раствор сернокислого аммония. Раствор отстаивают не менее 30 минут при температуре не выше +5°С. Затем, с помощью центробежного насоса раствор передают на нутч-фильтр, где происходит отделение осадка.

Т.П.2.4. Кристаллизация химотрипсиногена и отделение его от трипсина. Полученный осадок растворяют в емкости в равном объеме охлажденной до +8-12°С дистиллированной воды. В растворе устанавливают pH 3,0 (по универсальной индикаторной бумаге) с помощью 5 н раствора серной кислоты. Далее, из раствора проводят высаливание химотрипсиногена добавлением охлажденного насыщенного раствора сульфата аммония из расчета 1/3 объема к весу осадка. Раствор сульфата аммония добавляют медленно при постоянном перемешивании. Полученный раствор должен быть прозрачным или слегка опалесцирующим. Доводят pH раствора до 5,0

добавлением 5 н раствора едкого натра, pH раствора контролируют по потенциометру – pH 5,5. Затем раствор нагревают на водяной бане до 24-25 °С. Температура воды бани не должна быть выше 30°С. Кристаллизацию химотрипсиногена ведут 20-36 часов при температуре 24-26°С. Конец процесса кристаллизации определяют по появлению прозрачного недосадочного слоя. Осадок кристаллического химотрипсиногена отделяют на воронке Бюхнера. Не снимая с воронки, осадок промывают раствором сернокислого аммония 0,25 насыщения (250 мл насыщенного раствора довести до 1 л дистиллированной водой). Для промывания берут не менее 200 мл на одну воронку. Фильтрат с промывными водами после отделения химотрипсиногена переносят в холодную камеру и передают для получения кристаллического трипсина на стадию ТП.4.

ТП.4. Получение кристаллического трипсина. Все операции по очистке и кристаллизации трипсина проводят при температуре не выше +5°С.

ТП.4.1. Высаливание аморфного трипсина и очистка от балластных веществ. После отделения химотрипсиногена, фильтрат с промывными водами собирают в емкости, замеряют его объем. Доводят pH фильтрата до 3,0 (по потенциометру) 5н раствором серной кислоты. Затем проводят высаливание аморфного трипсина кристаллическим сернокислым аммонием из расчета 304 г на 1л раствора. Высаливание ведут при непрерывном перемешивании. После высаливания раствор отстаивают не менее 1 часа. Выпавший осадок трипсина отделяют на вакуумах, на воронках Бюхнера. Осадок взвешивают и растворяют в трех объемах (к весу осадка) дистиллированной воды, охлажденной до температуры не выше +5°С. Растворение ведут в емкости. Там же осаждают балластные белки. Осаждение проводят охлажденным насыщенным раствором сульфата аммония из расчета: два объема раствора к весу осадка. Для лучшего отделения балластных веществ в раствор добавляют кизельгур из расчета 10-20 г/л и фильтруют под вакуумом на воронке Бюхнера через слой кизельгура.

Фильтрат из колбы Бунзена переносят в емкость. Объем фильтрата замеряют [20].

ТП.4.2. Осаждение аморфного трипсина. Осаждение аморфного трипсина проводят равным объемом (к объему фильтрата) охлажденного насыщенного раствора сульфата аммония. Раствор сульфата аммония добавляют тонкой прерывистой струей со скоростью около 70 мл/мин, при постоянном перемешивании. После высаливания осадок отстаивают не менее трех часов.

ТП.4.3. Смена ионов и кристаллизация трипсина. Прозрачный надосадочный слой сифонируют, а остальной раствор фильтруют на воронках Бюхнера. Толщина слоя осадка на воронках не должна превышать 1 см.

Не давая осадку трипсина подсохнуть, его тут же на воронках промывают небольшим количеством 150-200 мл насыщенного раствора сернокислого магния в 0,02 н растворе серной кислоты. Смену ионов проводят быстро во избежания ослизнения осадка. Далее, осадок взвешивают (включая и медообразный осадок), растворяют в равном объеме (к весу осадка) 0,4 М боратного буфера pH 9,0. Растворение ведут в холодной камере, в емкости.

Растворы для кристаллизации трипсина следует предварительно охлаждать до +5°С.

В растворе трипсина pH доводят до значения 7,6 - 7,8 (по потенциометру) добавлением насыщенного раствора двууглекислого калия. Замеряют общий объем полученного раствора и к нему добавляют равный объем охлажденного насыщенного водного раствора сернокислого магния. Затем вносят затравку перекристаллизованного трипсина (60 г суспензии). Смесь переливают из емкости в бутыль. Бутыль предварительно промывают 0,5% раствором тимола. Горловины бутылей закрывают ватно-марлевыми пробками, пропитанными тем же раствором тимола. По мере высыхания пробки повторно пропитывают 0,5% раствором тимола.

Смесь в бутылях оставляют для кристаллизации при температуре +2÷+7°С на 11-15 суток. Образовавшийся осадок кристаллического трипсина отделяют

на воронках Бюхнера или с помощью центрифуги. Фильтрат используют для производства пантрипина.

ТП.4.4. Перекристаллизация трипсина. Осадок переносят в емкость (в холодной камере) и растворяют в 0,02 н растворе серной кислоты. Для лучшего растворения осадка в раствор добавляют по каплям 5 н раствор серной кислоты, pH раствора должен быть ниже 3.0 (по универсальной индикаторной бумаге). Затем pH доводят до 7,6- 7,8 (по потенциметру) 0,4 М боратным буфером pH 9,0, а затем вносят затравку перекристаллизованного трипсина (30 г суспензии).

Кристаллизация начинается через 20-45 минут и ведут ее при температуре не выше +5°С. Кристаллы трипсина могут храниться с недосадочной жидкостью в холодной камере при температуре не выше +5°С.

ТП.4.5. Диализ. Диализ трипсина проводят против дистиллированной воды при pH 2,5-3,0 и температура не выше +7°С. В эмалированную ванну в холодной камере, наливают дистиллированную воду из сборника. Воду в ванне подкисляют соляной кислотой до pH 2,5-3.0 (по универсальной индикаторной бумаге), а затем охлаждают.

Перед диализом кристаллы трипсина отделяют на воронках Бюхнера. Полученный осадок растворяют в семи объемах (к весу осадка), охлажденной до+5-7°С дистиллированной воды, а затем разливают в целлофановые мешки по 100 мл в каждый. Мешочки подвешивают к деревянной рейке и опускают их в подготовленную воду для диализа. Диализ проводят в течение 8-12 часов.

ТП.4.6. Обессоливание. Диализованный раствор собирают в эмалированную емкость, замеряют объем и устанавливают pH 3,0 (по потенциометру) добавлением 10% раствора соляной кислоты. Затем проводят осаждение сульфат - ионов постепенным добавлением 10%-го раствора хлористого бария, начиная с 1/3 объема к весу осадка трипсина, взятого на диализ. Проверяют полноту осаждения сульфат - ионов: для этого в пробирку

отбирают 5 мл отфильтрованного раствора и добавляют к нему несколько капель 10% раствора хлористого бария. Проба не должна давать помутнения:

а) если раствор прозрачный, то полнота осаждения сульфат - ионов достигнута;

б) если раствор мутный - полнота осаждения не достигнута,- необходимо в раствор трипсина добавить еще 20-30 мл 10% раствора хлористого бария и вновь проверить на полноту осаждения. Эту операцию проводят до полного осаждения сульфат - ионов. Выпавший осадок отделяют фильтрацией на воронках через складчатые бумажные фильтры из фильтровальной бумаги или центрифугированием. Фильтрацию ведут в холодной камере при температуре не выше +7°С. Фильтрат собирают в промежуточную емкость, далее передают на ионо - обменную колонку для освобождения от избытков ионов бария.

В чистую сухую ионообменную колонку загружают (предварительно залитую 0,5-1,0 л дистиллированной воды) смолу КУ-2-8 в H^+ форме, из расчета 0,2 кг сухой смолы на 1 кг осадка трипсина, взятого на диализ [17].

Соотношение высоты слоя смолы к диаметру колонки должно быть не менее 2:1. После заполнения колонки смолой, дистиллированную воду сливают, не оголяя слоя смолы.

Раствор трипсина в колонку заливают небольшими порциями, не допуская оголения смолы. Из колонки раствор должен выходить тонкой струей. Его собирают в стеклянный стакан, а потом в емкость. Температура раствора при обессоливании должна быть не выше +7°С. Для этого раствор до подачи на колонку и после выхода из колонки охлаждают льдом. Весь пропущенный через ионно-обменную колонку раствор трипсина порциями проверяют на отсутствие ионов бария: к 5 мл раствора добавляют несколько капель 10% раствора серной кислоты - проба не должна мутнеть.

Если проба помутнела, необходимо прекратить подачу раствора на колонку, заменить смолу КУ-2-8, а раствор, содержащий ионы бария, повторно пропустить через смолу. В обессоленном растворе трипсина устанавливают

pH 2,8-3,2 (по потенциометру) добавлением 5Н раствора едкого натрия. Далее, отбирают пробу обессоленного раствора в пробирку и сдают в лабораторию ОТК для определения pH и содержания сухих веществ в 1 мл раствора.

ТП.7. Получение стерильного продукта.

ТП.7.1 Стерильная фильтраци.(прил.5). Перед началом стерильной фильтрации раствора препарата фильтр «Пилот» промывают раствором соляной кислоты. Для этого в емкость заливают раствор соляной кислоты с pH 3,0 (3,5 мл соляной кислоты, разбавленной 1:2, на 12,0 л дистиллированной воды). Воду заливают из расчета: 1 л воды на одну фильтрующую пластину.

ТП.7.2. Стерильный розлив. За 2-3 часа до начала стерильного розлива препарата включают бактерицидные лампы. Непосредственно перед розливом, в бокс вносят кассету, с розливочным шприцем, бутыли со стерильным раствором и другие вспомогательные материалы. Стерильный розлив во флаконы можно вести параллельно с процессом стерильной фильтрации. Розлив осуществляют на разливочной машине с помощью разливочного шприца. Дозу розлива настраивают на дистиллированной воде или непосредственно на растворе и периодически проверяют ее через каждые 3-5 кассет. Кассету с флаконами ставят на стол, снимают крышку, накрывают стерильной салфеткой и начинают розлив по флаконам. Закончив заполнение флаконов в одной кассете, машину розлива выключают. В кассету с флаконами вкладывают этикетку с названием препарата и номера схема. Кассету закрывают крышкой и переносят в морозильную камеру или в сублиматор для проморозки. В конце процесса розлива проверяют стерильность разливаемого раствора. Для этого непосредственно с разливочной машины проводят посев разливаемого раствора на питательную среду. После окончания розлива разливочный узел демонтируют и промывают. Из бокса выносят все инструменты и

вспомогательные материалы. Емкость, для приема стерильного раствора вывозят из бокса для промывки.

Подготовка и стерилизация разливочного шприца. Проверяют целостность шлангов и закрывают их отверстия тампонами из безворсовой ткани. Обертывают пергаментной бумагой, смоченной дистиллированной водой, разливочную иглу, металлические части корпуса шприца и шланги. Все детали шприца еще раз заворачивают в пергаментную бумагу и вкладывают в кассету для стерилизации. Стерилизацию проводят в автоклаве в течение 1 часа при давлении 1,0-1,1 атм. После окончания процесса стерилизации кассеты переносят в сушильный шкаф для просушки.

ТП.7.3.Замораживание и сублимационная сушка

7.3.1 Проморозка продукта. Проморозку ведут в морозильной камере или в сублиматоре. Раствор, оставшийся от стерильной фильтрации и розлива, промораживают в морозильном столе.

Подготовка морозильной установки. Проводят внутренний осмотр камеры. В случае необходимости камеру чистят, моют, убирают воду, подсушивают. Затем обрабатывают 0,5% раствором аммиака и ставят в чашках на 2-4 часа 3 % раствор формалина. После обработки морозильную камеру охлаждают до температуры -35-45°С. При достижении данной температуры кассеты с разлитыми флаконами помещают на полки морозилки. Проморозку продукции ведут не менее 8 часов. Допускается промораживание в сублиматоре. В этом случае загрузку продукта проводят при температуре на полках сублиматора -25-30°С. Продукт промораживают не менее 3-4 часов с момента достижения температуры в продукте не выше -30°С. Контроль за температурой полок и продукта ведут по логометру.

7.3.2.Сублимационная сушка ферментов во флаконах. Сушка ферментов происходит на сублимационной установке. Загрузку продукта начинают при температуре на конденсаторе льда -45-50°С, а полок- -25-30°С. Кассеты с флаконами быстро ставят на полки сублиматора; не касаясь руками флаконов. Подключают контакты датчиков температуры продукта.

Регулирование температуры во время процесса сушки осуществляют регулятором температуры, а контроль температуры - по логометру. При достижении температура в конденсаторе льда не выше -50°С, а температуры полок -30°С, переходят к сушке продукта. Сушку ведут при вакууме не выше 100-150 ммк. Контроль вакуума осуществляют по миллиамперметру. Задают температуру нагрева полок и каждый час осуществляют контроль параметров сушки: температуры полок и температуры в продукте. С момента начала сушки Температуру полок увеличивают каждый час на 10°С и доводят температуру в продукте до+30+36°С. После окончания процесса сушки отключают все приборы. Убирают из кассет флаконы, в которых находятся датчики. Каждую кассету с флаконами вынимают из сублиматора и быстро накрывают стерильной салфеткой из безворсовой ткани. Кассеты ставят на тележку и перевозят к столу, для стерильной купорки флаконов.

ТП.8.Упаковка готовой продукции.

ТП.8.1.Закатка флаконов. На флаконы надевают алюминиевые колпачки и обжимают их на закаточной машине. При этом колпачок должен плотно прилегать к резиновой пробке и флакону**.** Закатанные флаконы высыпают в металлические ящики и направляют на маркировку.

ТП.8.2. Маркировка флаконов и контроль готовой продукции. Закатанные флаконы ставят в специальные кассеты, которые устанавливают в бункере печатной машины и наносят с помощью клише печать со следующим текстом:

1. Название препарата.
2. Дозировка (количество мг во флаконе)
3. Стерильно.
4. Номер серии.
5. Годен до.
6. Номер регистрационного удостоверения.
7. Название предприятия
8. Цена.

В ходе работы периодически проверяют качество печати. Отпечатанные флаконы высыпают в кассеты и выдерживают на стеллажах в течение суток при комнатной температуре до полного высыхания краски. Затем отпечатанные флаконы отправляют на просмотр. Флаконы просматривают за столом под лампой дневного света. Отбраковывают флаконы по следующим признакам:

1. Флаконы с поврежденными или открывшимися пробками.
2. Флаконы с неправильной дозировкой препарата.
3. Битые флаконы.
4. Грязные флаконы.
5. С плохим качеством закатки, печати.

Флаконы с плохим качеством закатки освобождают (с сохранением стерильности) от колпачков и вновь направляют на закатку. Плохую печать на флаконах снимают ацетоном или скипидаром и вновь направляют на маркировку. Закатанные и отмаркированные флаконы отбирают для предварительного контроля: химического и бактериологического анализа.

Продукция не прошедшая предварительный контроль, подвергается переработке согласно стадии 3. Переработка отходов. 1.1 Флаконы с препаратом, прошедшие предварительный контроль направляют на упаковку. *ТП.8.3. Упаковка готовой продукции.* Флаконы осторожно высыпают на столы расфасовки и вручную укладывают по 10 флаконов в пачки с перегородками (вкладышами). Туда же вкладывают инструкции по применению или листок вкладыш. На каждой пачке предварительно проставляют номер серии и срок годности. Пачки упаковывают в групповую тару в соответствии ГОСТ 17768-90 [2], а затем в дощатые ящики. После получения из лаборатории ОТК положительного ответа контролер ОТК производит приемку готовой продукции и отбор образцов: химический анализ, биологический анализ, арбитраж.

При приемке готовой продукции контролер ОТК проверяет внешний вид, упаковку, маркировку продукции, качество тары на соответствии

требованиям ГОСТ 17768-90 [2] и действующей нормативно - технической документацией на продукцию.

При выявлении первого дефекта контролер, прекращает приемку и продукцию возвращают на доработку. Ящики с готовой продукцией окантовывают металлической лентой, забивают гвоздями и отправляют на склад готовой продукции [17].

ПО.1. Переработка возврата.

ПО.1.1. Растворение возврата (переработка производственного брака)

При производстве серий ферментов, не соответствующих требованиям фармакопейной статьи, их подвергают переработке. Отбракованную продукцию во флаконах отправляют на растворение. Для этого флаконы с препаратом вскрывают и устанавливают в кассеты. На разливочной машине разливают по 1 мл (в каждый флакон), предварительно охлажденную до температуре не выше +10°С, дистиллированную воду. На кассету надевают металлическую решетчатую крышку и через нее раствор сливают и передают на последующую переработку в зависимости то вида брака:

а) забраковка препарата по посторонним включениям, недоливу, «вскипевшие», незакатанные, по неправильной дозировке - слитый раствор фильтруют через складчатые фильтры из фильтрованной бумаги и подсоединяют к новой серии на стадии ТП.7.1. «Стерильная фильтрация».

б) забраковка по плохой растворимости или прозрачности - раствор фильтруют через складчатый бумажный фильтр или через пластины для удаления труднорастворимых частиц. Определяют pH раствора и его сухой остаток, а затем раствор может быть присоединен к последующей серии и выпущен как новая серия.

в) забраковка по пониженной активности – слитый раствор подкрепляют обессоленным раствором новой серии препарата с большой активностью. Во вновь полученной серии определяю pH, содержание сухого вещества и направляют на стадию ТП.7.1, для дальнейшей обработки.

г) забраковка по нестерильности – флаконы с препаратом растворяют в дистиллированной воде, определяют содержание сухого остатка и pH, и направляют на стадию ТП.7.1. «Стерильная фильтрация». Раствор присоединяют к последующей серии или выпускают, новую серию.

д) забраковка по токсичности – раствор отправляют на стадию «Обессоливание». Далее обессоленный раствор присоединяют к последующей серии и подвергают дальнейшей обработке.

е) повышенное содержание сульфатов – раствор подсоединяют к последующей серии на стадии ТП.4.4.»Диализ».

ж) забраковка по пирогенности – препарат растворяют, раствор отправляют на стадию ТП.7.1. «Стерильная фильтрация» [20].

4. Методика определения качества готового препарата трипсин

Метод определения протеолитической активности основан на определении количества п - нитроанилина, освобождаемого трипсином из синтетического субстрата – хлоргидрата N-альфа-бензол-DL-аргинин-п-нитроанилида (БАПНА) в определенных условиях.

Препарат имеет 1 п - нитроанилиновую единицу активности (протеолитическую единицу), если при воздействии его на субстрат в течение 1 мин, освобождается такое количество продуктов гидролиза, которое при 405 нм дает величину экстинкции, соответствующую 1 микромолю п - нитроанилина [15].

Для приготовления 0,1 М трис-HCl буферного раствора с pH *7,8.*берем 12,114 г трис-(оксиметил)-аминометана и 5,47 г кальция хлорида ($CaCl_2 \times H_2O$) помещаем в мерную колбу вместимостью 1000 мл растворяем в 900 мл H_2O.Прибавляем 1 М раствора хлористоводородной кислоты при постоянном перемешивании до pH 7,8 и доводим объем раствора водой до метки (срок годности раствора один месяц).

Приготовление раствора субстрата. 100 мг (точная навеска) хлоргидрата БАПНА «Sigma» растворяем в 10 мл ДМСО (диметилсулфоксид) при нагревании на водяной бане, при температуре 35 ± 0,5°С. Срок годности раствора трое суток при хранении в холодильнике.

Приготовление 5М раствора уксусной кислоты. В мерную колбу вместимостью 100 мл прибавляем 30 мл уксусной кислоты ледяной, доводим объем раствора водой до метки и перемешиваем.

Для приготовления испытуемого раствора берем 50 мг (точная навеска) препарата трипсин кристаллический помещаем в мерную колбу, вместимостью 100 мл, прибавляем 70 мл 0,1 М трис-HCl буферного раствора с pH 7,8, перемешиваем до растворения и доводим объем раствора этим же буферным раствором до метки. Затем 2,5 мл полученного раствора помещают в мерную колбу, вместимостью 50 мл, доводим объем раствора 0,1

М трис-HCl буферным раствором с pH 7,8 до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленный.

Методика определения протеолитической активности. В две пробирки (опытные) вместимостью 10 мл помещаем 4,4 мл 0,1 М трис-HCl буферного раствора pH 7,8, а в две другие пробирки (контрольные) - 4,8 мл 0,1 М трис-HCl буферного раствора pH 7,8. Далее в опытные пробирки прибавляем по 0,4 мл испытуемого раствора. Все пробирки помещаем в термостат с температурой 25 ±0,5°С на 5 минут (по секундомеру) с интервалом в 30 сек. В каждую пробирку прибавляем по 0,2 мл раствора субстрата с интервалом в 30 секунд и выдерживаем в термостате при температуре 25 ±0,5°С 15 мин. Затем для прекращения гидролиза в каждую пробирку прибавляем по 1 мл 5 М раствора уксусной кислоты с интервалом в 30 секунд. Пробы охлаждают и измеряют оптическую плотность гидролизата на спектрофотометре при длине волны 405 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. Раствор сравнения – контрольная проба. Параллельно измеряют оптическую плотность раствора п-нитроанилина, контролем для которого является реакционная смесь, используемая для растворения данного реактива [15].

Протеолитическую активность трипсина в протеолитических единицах на миллиграмм (Х) вычисляют по формуле 1:

$$X=\frac{A*6*100*50}{K*0,4*15*a*2,5}=\frac{A*2000}{K*a}, \text{ ПЕ/мг (1)}$$

где, А - оптическая плотность испытуемого раствора;

а - навеска препарата в миллиграммах;

К - коэффициент микромолярной экстинкции п-нитроанилина (определяется экспериментально);

50,100 - объем раствора испытуемого препарата, в мл;

2,5 - объем раствора препарата взятый, взятый для разведения, в мл;

0,4 - объем, испытуемого раствора, взятый для анализа, в мл;

6 - объем гидролизата в одной пробирке, в мл;

15 - время ферментативной реакции в мин.

1 мг препарата должен содержать не менее 1,2 п-нитроанилиновых единиц (протеолитических единиц).

Коэффициент микромолярной экстинкции п-нитроанилина вычисляют по формуле 2:

$$K=\frac{A*138*100*100*P}{a*1000}=\frac{A*1381*P}{a}=\frac{0.2*1381*1}{50}=5,5 \quad (2)$$

где, А – оптическая плотность при 405 нм, раствор сравнения- реакционная среда;

а – навеска п-нитроанилина, мг;

138,1 –молекулярная масса п- нитроанилина;

100*100 – разведение навески п-нитроанилина;

Р – дополнительное разведение навески п-нитроанилина;

1000 – пересчет навески в мкг.

Раствор используется свежеприготовленным.

В результате исследования получены следующие показатели (табл.4.1)

Таблица 4.1

Оптическая плотность трипсина

Исследуемые пробы	А (оптическая плотность)
O_1(первая опытная проба)	0,210
O_2 (вторая опытная проба)	0,199
K_1(контроль)	0,000
K_2(контроль)	0,000

Расчет протеолитической активности следующий:

$$X=\frac{A*6*100*50}{K*0,4*15*a*2,5}=\frac{A*2000}{K*a}=\frac{0,210*2000}{5,5*50}=1,527 \text{ ПЕ/мг.}$$

$$X=\frac{A*6*100*50}{K*0,4*15*a*2,5}=\frac{A*2000}{K*a}=\frac{0,199*2000}{5,5*50}=1,447 \text{ ПЕ/мг.}$$

Вывод: так как 1 мг препарата должен содержать не менее 1,2 ПЕ, полученные результаты измерения активности трипсина - 1,527 ПЕ и 1,447 ПЕ, признаются удовлетворяющими требованиям ФСП на данный препарат.

5. Экологические и экономические аспекты производственного процесса

При получение препарата трипсин, на стадиях выделения фермента происходит образование значительных количеств отходов, которые существенно варьируются по составу. В соответствии с современным подходом к экологической безопасности предприятия, технология производства ферментов должна включать в себя технологические решения переработки образующихся отходов и стоков.

Получение ферментного препарата происходит последовательно при обработки поджелудочной железы различными типами экстрагентов, такими как солевой раствор, растворы кислот и спирта. Переработка отходов поджелудочной железы может быть осуществлена путем использования шлама биомассы непосредственно на корм скоту, поскольку данный отход обладает сравнительной высокой питательной ценностью и является нетоксичным или поступает на завод технических полуфабрикатов.

В производстве ферментных препаратов используется ряд вредных веществ загрязняющих воздух рабочей зоны производственных помещений и атмосферный воздух населенных мест, обладающими токсичными свойствами (табл. 5.1.). Попадая в организм человека, такие вещества могут вызвать отравления и заболевания.

Степень воздействия различных веществ на организм человека зависит от дисперсности раздражителя, его концентрации, продолжительности взаимодействия и путей проникновения на организм. Основными путями проникновения токсических веществ в организм являются органы дыхания, кожа, пищеварительный тракт (при приеме пищи в цехе, недостаточно тщательное мытье рук перед едой [6].

Таблица 5.1.

Перечень вредных веществ, загрязняющих воздух рабочей зоны производственных помещений и атмосферный воздух населенных мест

№	Наименование веществ и в какой форме они попадают в воздух	Предельно-допустимая концентрация мг/м^3	
		В воздухе рабочей зоны производственных помещений	В атмосферном воздухе населенных мест
1.	Пары соляной кислоты	5 мг/м^3	0,2 мг/м^3
2.	Аммиак (пары)	20	0,2
3.	Фенол (пары)	5+	0,01
4.	Пары серной кислоты	1	-

Примечание : «+» опасно также при поступление через кожу

Экономические показатели (табл.5.2.) ООО «Самсон-Мед» за 2014 год по РСБУ выросла в 2,71 раза до 129,21 млн. руб. с 47,62 млн. руб. годом ранее. руб. с 522,75 млн. руб. за аналогичный период прошлого года. Себестоимость продукции за отчетный составила 339,04 млн. руб. Прибыль от продаж повысилась в 2,03 раза до 150,88 млн. руб. с 74,36 млн. руб. за аналогичный период прошлого года. Согласно материалам компании, чистая прибыль за 2013 год выросла до 47,62 млн. руб. 2012 год Чистая прибыль ООО "Самсон-Мед" за 2012 год по РСБУ выросла в 3,19 раза до 30,23 млн. руб. по сравнению с 9,48 млн. руб. годом ранее. Это следует из отчета компании [22].

Таблица 5.2

Экономические показатели предприятия ООО «Самсон – Мед»

	2011	2012	2013	2014
Выручка (тыс. руб.)	379392	456835	522748	629689
Чистая прибыль (тыс. руб.)	9482	30227	47620	129211

6. Техника безопасности и охрана труда

На предприятии ООО «Самсон-Мед» уделяется большое внимание вопросам охраны труда и мероприятиям, призванным обеспечить безопасность всех работающих на предприятиях. Для обеспечения безопасных условий труда постоянно совершенствуются нормы и правила техники безопасности [6].

Система мероприятий по охране труда:

Работники, впервые поступающие на работу допускаются к самостоятельной работе только после прохождения вводного инструктажа по охране труда, вводного инструктажа по пожарной безопасности, первичного инструктажа по охране труда на рабочем месте.

Работа может сопровождаться наличием следующих опасных и вредных технологических факторов:

- использование в технологических процессах токсичных, раздражающих, взрывопожароопасных веществ;

- работа с электроприборами (приборы освещения, электроинструмент, электрифицированное оборудование и т.д.);

- наличие грузоподъёмных механизмов;

- наличие на территории посторонних лиц;

- неудовлетворительное состояние дорожного покрытия (гололед, грязь, неровности дороги и др.);

Курение допускается только в специально отведенных местах, обозначенных соответствующим знаком безопасности.

В случае получения травмы работником или ухудшения его самочувствия. На производстве принимаются меры по оказанию первой помощи пострадавшему и при необходимости доставку его в учреждение

здравоохранения, принимаются меры к сохранению обстановки, такой, какой она была на момент несчастного случая или аварии, если это не угрожает жизни и здоровью людей и не ведет к развитию аварии.

Лица, не выполняющие требования настоящей инструкции, привлекаются к ответственности в соответствии с действующим законодательством.

Требования охраны труда перед началом работы:

- прибывать на работу следует заблаговременно для исключения спешки.

- осмотреть свое рабочее место и оборудование. Убрать все лишние предметы. Убедиться путем визуального осмотра в наличии и исправности инструментов, приспособлений.

- обо всех нарушениях или замечаниях в работе оборудования сообщать руководителю работ и не приступать к работе до их устранения.

Требования охраны труда во время работы:

- выполнять только работу, обусловленную должностными или профессиональными обязанностями, правильно используя при этом средства индивидуальной и коллективной защиты. При необходимости выполнения других работ работник должен получить целевой инструктаж по охране труда у соответствующего руководителя, ответственного за безопасное производство работ.

- необходимо в течение всего рабочего дня содержать в порядке и чистоте рабочее место, не допуская его захламления.

- запрещается входить в технические и хозяйственные помещения, не относящиеся к выполнению непосредственных должностных или профессиональных обязанностей и не предназначенные для нахождения там посторонних лиц.

Требования охраны труда в аварийных ситуациях:

- немедленно прекратить работу, отключить электрооборудование и доложить руководителю работ, в случаях:

1. Поражения кого-либо из работников электрическим током;
2. Обнаружения механических повреждений и иных дефектов электрообрудования и электропроводки, наблюдения повышенного уровня шума или тепловыделения при работе оборудования;
3. Ощущение запаха гари, появления дыма, огня;
4. Прекращения подачи электрической энергии.

Об аварийной обстановке оповестить об опасности окружающих лиц, доложить непосредственному руководителю о случившемся. Не приступать к работе до полного устранения неисправностей.

При обнаружении запаха газа в помещении:

- предупредить работников, находящихся в помещении, о недопустимости пользования открытым огнем, курения, включения и выключения электрического освещения и электроприборов;
- открыть окна (форточки, фрамуги) и проветрить помещение;
- доложить непосредственному руководителю;
- вызвать работников аварийной газовой службы.

В случае возгорания или пожара немедленно прекратить работу, отключить электроприборы, вызвать пожарную охрану, сообщить руководителю работ и приступить к ликвидации очага пожара имеющимися средствами огнетушения, а при невозможности тушения- покинуть опасную зону.

Требования охраны труда по окончанию работы:

- привести в порядок рабочее место, убрать мусор.
- собрать инструмент, детали, приспособления, привести в надлежащий порядок и убрать в отведенное для этого место.
- отключить и обесточить электрооборудование.
- снять средства индивидуальной защиты и поместить их в специально отведенное для этого место.
- сообщить непосредственному руководителю обо всех недостатках, которые имели место во время работы и о принятых мерах по их устранению.

Меры пожарной безопасности:

Инструкция по охране труда и технике безопасности устанавливает общие требования пожарной безопасности в помещениях и на территории ООО «Самсон-Мед», являющиеся обязательными для исполнения всеми сотрудниками и посетителями предприятия [12]. Все работники предприятия должны допускаться к работе только после прохождения противопожарного инструктажа. Персональная ответственность за обеспечение пожарной безопасности предприятия возлагается на руководителя организации.

Ответственность за пожарную безопасность в служебных и производственных помещениях, закрепленных за структурными подразделениями, возлагается на руководителей структурных подразделений.

Работники предприятия обязаны:

- соблюдать требования пожарной безопасности;
- знать схему эвакуации и место расположения огнетушителей;
- знать правила пользования огнетушителями;
- держать всегда свободными от любых предметов подходы к средствам пожаротушения (огнетушители, пожарные ящики с рукавами).
- хранить легковоспламеняющиеся вещества в соответствии с правилами пожарной безопасности.

Сотрудник, ответственный за пожарную безопасность в производственном помещении, осуществляет: контроль соблюдения в помещениях правил пожарной безопасности, по окончании рабочего дня осмотр помещения, закрытие окон и форточек, отключение освещения и электрооборудования.

Выводы

1. Поджелудочная железа крупного рогатого скота содержит сложный набор гидролитических ферментов действующих на различные классы веществ – белки, жиры, нуклеиновые кислоты, углеводы. Некоторые ферменты (нуклеазы и амилазы) секретируются в поджелудочный сок сразу в активном состоянии, а другие ферменты - протеазы, фосфолипаза синтезируются тканью железы в виде неактивных предшественников– зимогенов и превращаются в активные ферменты уже в самом поджелудочном соке.

Известно, что поджелудочная железа КРС содержит целый ряд ферментов различной субстратной спецификации, в частности трипсин КФ (3.4.21.4), химотрипсин (3.1.1.3), карбоксиполипептидазы (КФ 3.4.16.1), рибонуклеазы.

2. Трипсин содержится в поджелудочной железе в виде предшественника фермента — зимогена, называемого трипсиногеном. Молекулярная масса трипсиногена 23,0÷23,8 кДа. Трипсины различного происхождения имеют близкий качественный и количественный набор аминокислот и форму кристаллов. Молекулы трипсина и трипсиногена имеют глобулярное строение. Бычий трипсин представляет собой белки с сильно выраженными основными свойствами, ИЭТ около pH 10,5, оптимум каталитической активности наблюдается в интервале pH 7,0-9,0, при температуре около 50°С. Трипсин состоит из 223 аминокислотных остатков, образующих одну полипептидную цепь, содержащую шесть дисульфидных связей. Последовательность аминокислотных остатков фермента полностью расшифрована.

3. Важным условием правильной организации сбора ферментного сырья является быстрое извлечение его из туши животного, что влияет на активность фермента. С момента извлечения поджелудочной железы до замораживания время не должно превышать 1,5 часа. Для сохранения

биологических свойств ферментное сырье после сбора и очистки консервируют.

4. В результате экспериментального анализа определения протеолитической активности готового трипсина, было установлено, что активность фермента в образцах составила 1,527 ПЕ и 1,447 ПЕ в 1 мг, что является удовлетворительными требованиям ФСП на данный препарат (1,2 ПЕ).

Заключение

На сегодняшний день компания ООО «Самсон-Мед» российское фармацевтическое предприятие полного производственного цикла: от производства субстанций до выпуска готовых лекарственных форм. Продукция компании завоевала себе прочное место на потребительском рынке труда и пользуется стабильным спросом.

Особое внимание к ферментным препаратам вызвано тем, что ферменты являются высокоактивными, нетоксичными биокатализаторами белкового происхождения, которые широко распространены в природе, без них невозможны многие биохимические процессы и жизнь в целом.

Поджелудочная железа крупного рогатого скота является ценным вторичным сырьем животного происхождения, которое используется при производстве ферментного препарата Трипсин

Препарат трипсин, выделенный из поджелудочной железы крупного рогатого скота – фермент, обладающий выраженными протеолитическими и противовоспалительными свойствами, расщепляют некротическую ткань, не оказывая действия на живые клетки благодаря наличию в них специфических антиферментов. Этот фермент выделен в кристаллической форме и отличается высокой степенью чистоты. Препарат вызывает также разжижение гнойного содержимого абсцессов, осложненных ран, обладает муколитическим действием. Всю большую актуальность приобретают способы (технологии) получения ферментов из экологически безопасного и доступного животного сырья, которые могут успешно конкурировать со средствами аналогичного действия, производимыми химическим и микробиологическим синтезом [25].

Существует множество подходов выделения и очистки ферментов: высаливание, осаждение органическими растворителями и т.д.

Однако эти методы многостадийны, трудоемки, при этом малоэффективны и не обеспечивают получения ферментов высокого качества. Наиболее перспективными, с точки зрения получения высококачественных белков,

являются методы избирательной сорбции на микропористых носителях – сорбентах, не изменяющих лабильную структуру ферментов. В настоящее время на предприятии ООО «Самсон - Мед» внедрена и успешно применяется эффективная сорбционная технология с использованием ионообменных процессов на стадиях разделения и очистки ферментов. Использование сорбционной технологии не только повысило качество выпускаемых препаратов, но и значительно сократило время технологического процесса, существенно снизило энергозатраты на производство единицы продукции. Для действующего в современных условиях предприятия это немаловажный фактор и очень веский аргумент в пользу проведения дальнейших научно-исследовательских работ прикладного характера [25].

ООО «Самсон – Мед» является производственной базой для разработки опытных образцов и экспериментальных серий новых лекарственных препаратов, разрабатываемых учеными. На базе НПЛ ООО «Самсон – Мед» ведутся разработки современных технологий получения большого ассортимента биологически активных веществ из сырья животного происхождения. Производство органопрепаратов имеет большую перспективу и должно развиваться как в направлении получения новых лекарственных форм и препаратов, так и для целей косметологии.

На парфюмерно-косметическом рынке на данный период практически отсутствуют натуральные композиции на основе биологически активных веществ животного происхождения. Производство подобной продукции – дело ближайшего будущего.

Список литературы

1. ГОСТ 11285-93 «Железы поджелудочные крупного рогатого скота и свиней замороженные. Технические условия».

2. ГОСТ 17768- 90 «Средства лекарственные. Упаковка, маркировка, транспортирование и хранение».

3. Веремеенко К.Н. Ферменты протеолиза и их ингибиторы в медицинской практике. Киев.: Здоров’я, 1971.- 216с.

4. Вракин В.Ф., Сидоров М.В. Морфология сельскохозяйственных животных.- М.: Агропромиздат,- 1991. - 528 с.

5. Грачева И.М., Кирова А.Ю. Технология ферментных препаратов.- М.: Элевар,- 2000.- 512 с.

6. Грачева И.М. Технология ферментных препаратов.- М.: Агропромиздат, - 2000.- 335 с.

7. Грицай Е.В, Рейн Л.М. Технология Субпродуктов эндокринно-ферментного и специального сырья. М.: Легкая и пищевая промышленность, -1982.- 184 с.

8. Деборин Г.А, М. И. Быстрова, В.Ц. Иванова. Изменение хода протеолиза сывороточного альбумина трипсином при образовании комплексов фермента или субстрата с экстрадиолом. Доклады Академии наук СССР. – 1959.-С.685 -124 .

9. Дэвени Т, Гергей Я. Аминокислоты, пептиды и белки. - М.: Мир, -1976.- 386 с.

10. Дудникова Е. А. Разработка гибкой малоотходной технологии переработки поджелудочной железы КРС с получением гидролитических ферментов. М.: ,-2009.- 160 с.

11. Инструкция по применению Трипсина, Химопсина, Химотрипсина. ООО «Самсон-Мед»

12. Инструкция о мерах пожарной безопасности в ООО «Самсон-Мед». Общие требования пожарной безопасности.

13. Канаев П.А, Шенгер А.А, Борисова Е.Ю. Трипсин – итоги экспериментальных и клинических исследований фармакотерепевтической эффективности препарата //Фармакотерапевтический альманах, 2009,-№ 3. С. - 10 .

14. Мосолов В.В. Протеолитические ферменты. - М.: Наука, -1987. - 404с.

15. Методика определения протеолитической активности Трипсина на предприятии ООО «Самсон-Мед».

16. Нортроп Д, Кунитц М, Херриот Р. Кристаллические ферменты перевод с англ. Н. Е.Плотниковой и др. - М.: Иностранная литература, 1950. - 346 с.

17. Рогов И. А., Забашта А. Г., Казюлин Г. П. Общая технология мяса и мясопродуктов. – М.: Колос, 2000.- 367 с.

18. Рогожкин В.В. Биохимия животных. - СПб.: ГИОРД, 2009. – 472 с.

19. Тарова З.Н, Расторгуев С.Л, Сухорукова Н.В. Ферментные препараты. Получение. Применение. - Мичуринск.: Изд-во МичГАУ, 2014.- 110 с.

20. Технологический регламент комплексного производства ферментных препаратов. – Ленинград, 1989.- 230 с.

Интернет- ресурсы:

21. http://www.allvet.ru/knowledge_base/physiology/anatomiya-i-fiziologiya-podzheludochnoy-zhelezy.php

22. (http://praktikum-po-anatomii-zhivotnyh.odn.org.ua/B3434Part36-170.html)

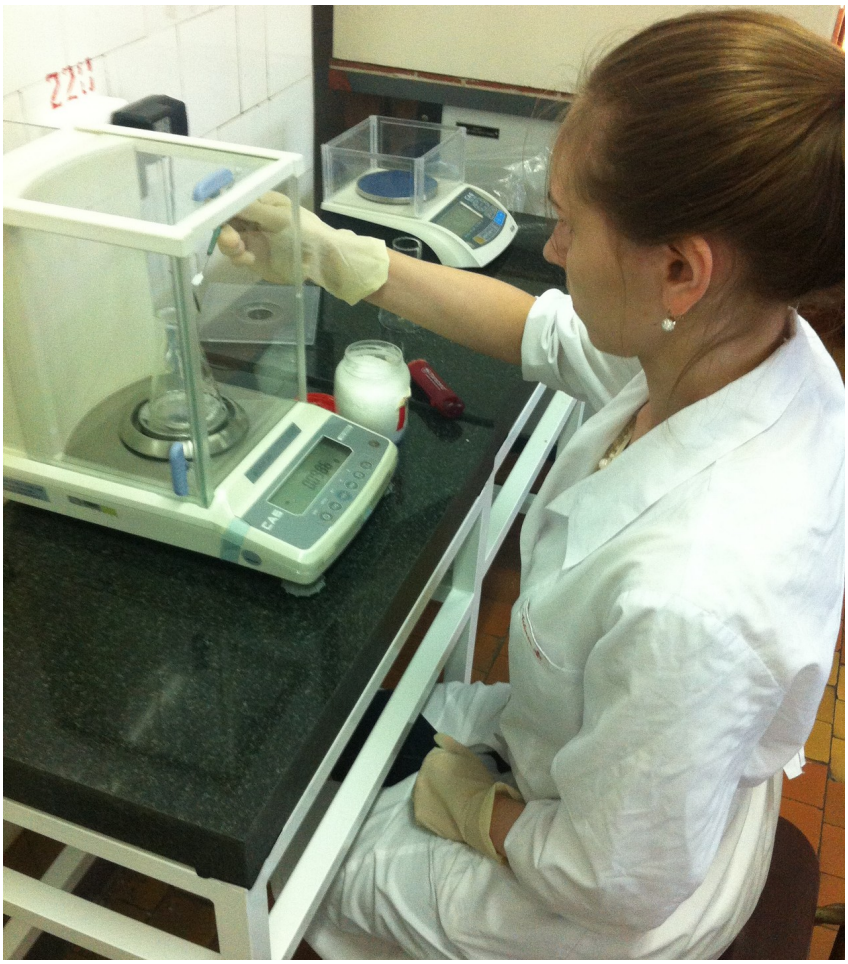
23. http://www.gastroscan.ru/handbook/120/508

24. http://www.k-agent.ru/catalog/7810173847-1027804852921

25.http://www.medicus.ru/pharmacology/specialist/organopreparaty-osoboe-napravlenie-farmindustrii-31434.phtml

Приложение

Приложение 1



Приготовление раствора субстрата, 100 мг (точная навеска) хлоргидрата БАПНА «Sigma»

Приложение 2



Подготовка, испытуемого раствора к измерению протеолитической активности трипсина

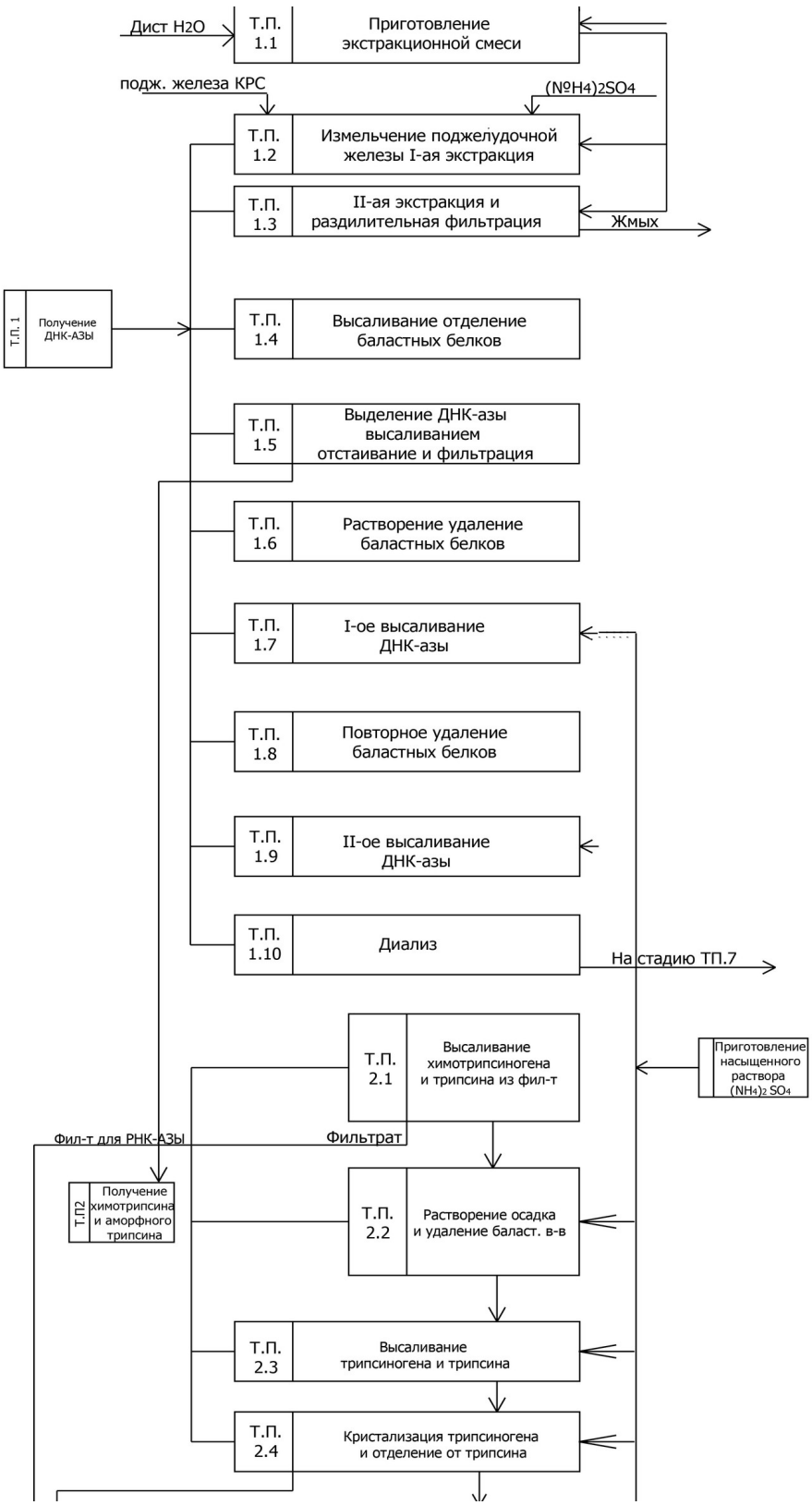
Приложение 3

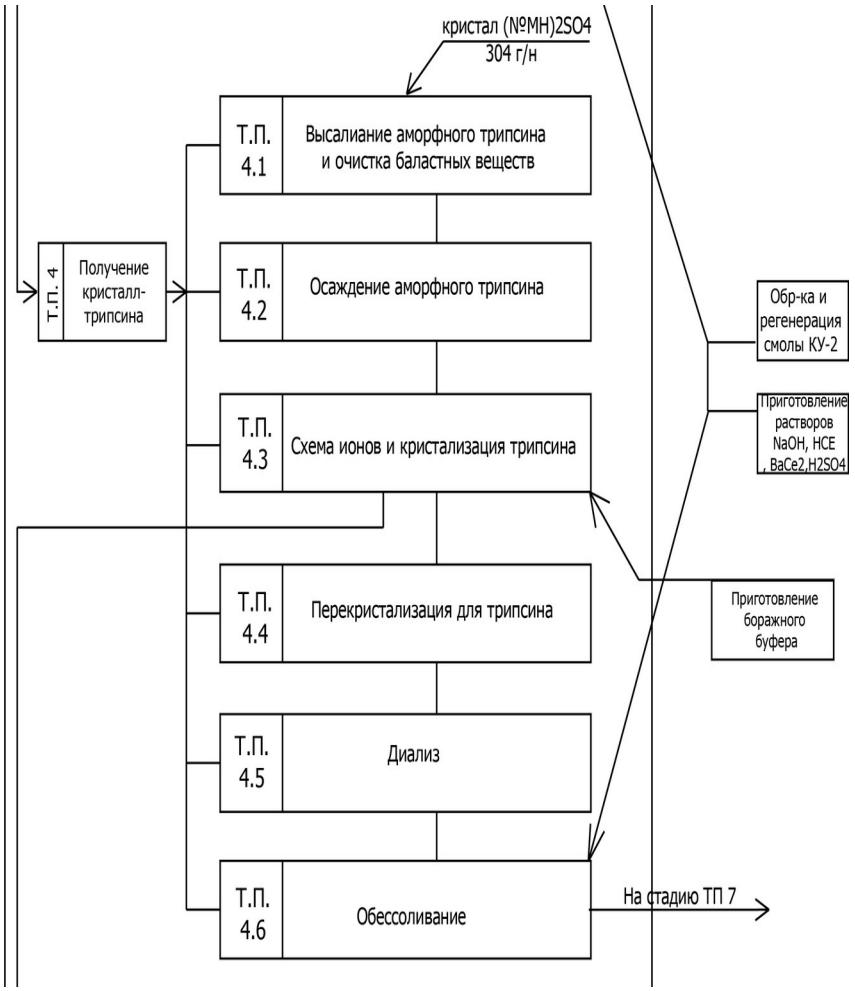


Определение оптической плотности испытуемого раствора на спектрофотометре

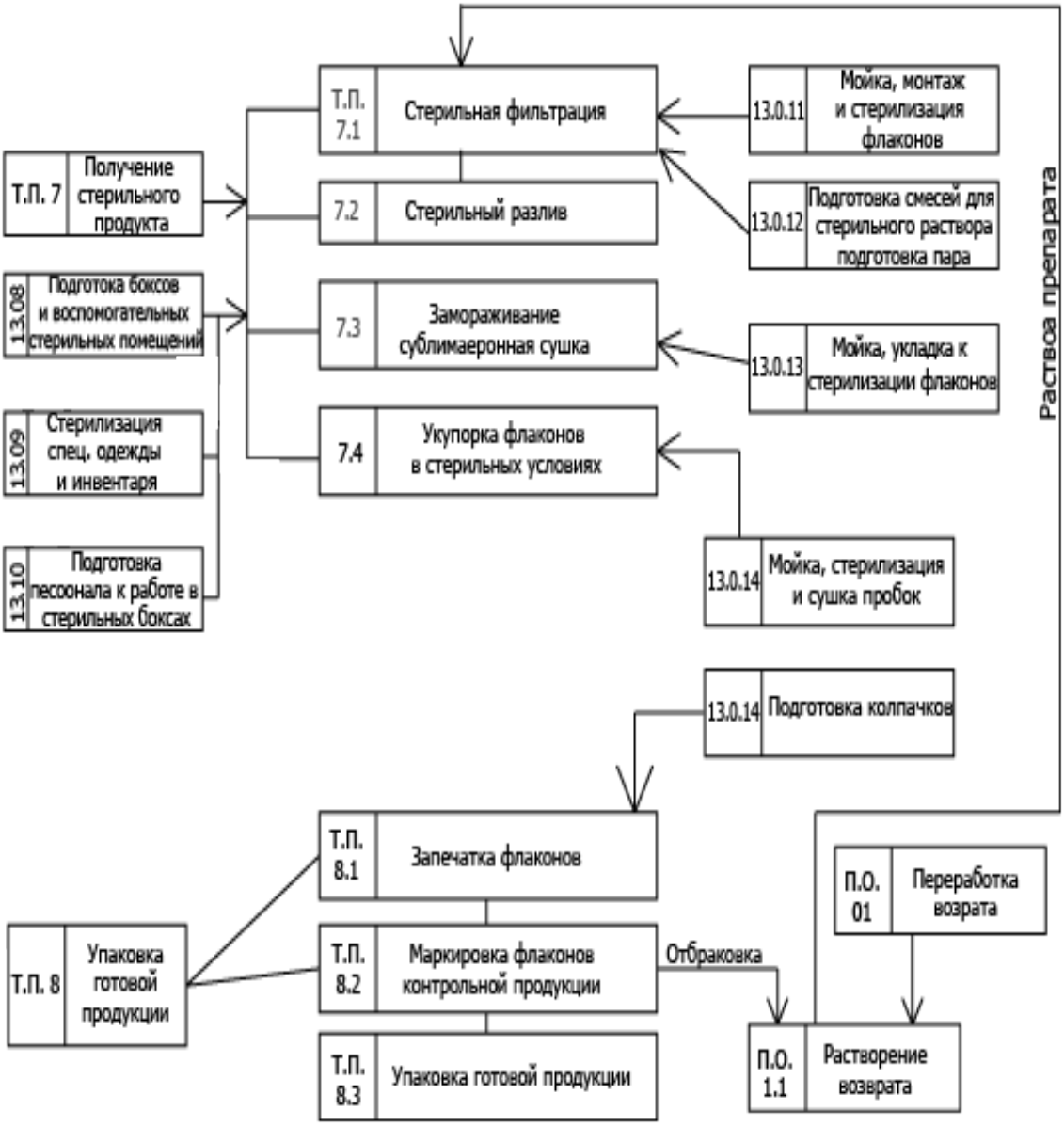
Приложение 4

Технологический процесс получения трипсина




кристал (№MH)2SO4
304 г/н
Т.П. 4.1
Высалиание аморфного трипсина и очистка баластных веществ
Т.П. 4
Получение кристалл-трипсина
Т.П. 4.2
Осаждение аморфного трипсина
Обр-ка и регенерация смолы КУ-2
Приготовление растворов NaOH, HCE , BaCe2,H2SO4
Т.П. 4.3
Схема ионов и кристализация трипсина
Т.П. 4.4
Перекристализация для трипсина
Приготовление боражного буфера
Т.П. 4.5
Диализ
Т.П. 4.6
Обессоливание
На стадию ТП 7

Приложение 5



Получение стерильного продукта