**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |  |
| --- | --- |
| **Калия хлорид+Кальция хлорид+Магния хлорид + Натрия ацетат+Натрия хлорид +Яблочная кислота, раствор для инфузий** **Kalii chloridum +Calcii chloridum+Magnii chloridum+ Natrii acetatum+ Natrii chloridum+ Acidi malicum, solutio pro infusionibus**  | ФС**Вводится впервые** |

Настоящая фармакопейная статья распространяется на лекарственный препарат Калия хлорид + Кальция хлорид + Магния хлорид + Натрия ацетат + Натрия хлорид + Яблочная кислота, раствор для инфузий. Препарат должен соответствовать требованиям ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения» и ниже приведенным требованиям.

Содержание действующих веществ в препарате (ионный состав в 1000 мл) приведено в таблице 1.

Таблица 1 – Содержание действующих веществ в лекарственном препарате в ммоль/л

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Наименование ионов | Содержание ионов  | Допустимое содержание ионов |
| Натрий-ион | 145,0 ммоль/л | от 137,8 до 152,3 ммоль/л |
| Калий-ион | 4,0 ммоль/л | от 3,80 до 4,20 ммоль/л |
| Кальций-ион | 2,5 ммоль/л | от 2,38 до 2,63 ммоль/л |
| Магний-ион | 1,0 ммоль/л | от 0,95 до 1,05 ммоль/л |
| Хлорид-ион | 127,0 ммоль/л | от 120,7 до 133,4 ммоль/л |
| Ацетат-ион | 24,0 ммоль/л | от 22,8 до 25,2 ммоль/л |
| Малат-ион | 5,0 ммоль/л | от 4,75 до 5,25ммоль/л |

**Описание.** Прозрачная бесцветная жидкость.

**Подлинность**

*1. Атомно-эмиссионная спектрометрия.* Величиныэмиссиииспытуемых растворов препарата, приготовленных для количественного определения натрий-иона и калий-иона, должны находиться в диапазоне значений эмиссии стандартных растворов натрий-иона и калий-иона при длине волны 589,0 нм для натрия и длине волны 766,5 нм для калия, измеренных в условиях количественного определения (раздел «Количественное определение»), (ОФС «Атомно-эмиссионная спектрометрия»).

*2. Атомно-абсорбционная спектрометрия.* Величины поглощенияиспытуемых растворов препарата, приготовленных для количественного определения кальций-иона и магний-иона, должны находиться в диапазоне значений абсорбции стандартных растворов кальций-иона и магний-иона, при длине волны 422,7 нм для кальция и длине волны 285,2 нм для магния, измеренных в условиях количественного определения (раздел «Количественное определение»), (ОФС «Атомно-абсорбционная спектрометрия»).

*3. Качественная реакция.* Объем препарата, соответствующий 2-10 мг хлорид-иона, должен давать характерную реакцию на хлориды (ОФС «Общие реакции на подлинность», Хлориды).

*4. Спектрофотометрия с использованием ферментного набора.* Наличие прироста поглощения испытуемого раствора препарата, приготовленного для количественного определения ацетат-иона, при длине волны 340 нм (раздел «Количественное определение»).

*5. Спектрофотометрия с использованием ферментного набора.* Наличие прироста поглощения испытуемого раствора препарата, приготовленного для количественного определения малат-иона, при длине волны 340 нм (раздел «Количественное определение»).

**Прозрачность раствора.** Препарат должен быть прозрачным. (ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей»).

**Цветность** **раствора**. Препарат должен выдерживать сравнение с эталоном В9 (ОФС  «Степень окраски жидкостей»).

**рН.** От 5,1 до 5,9 (ОФС «Ионометрия», метод 3).

**Осмолярность**. В соответствии с ОФС «Осмолярность». Теоретическая осмолярность препарата 309 мОсм/л.

**Механические включения**. *Видимые частицы*. В соответствии с ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

*Невидимые частицы* В соответствии с ОФС «Невидимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения».

**Извлекаемый объем**. Не менее номинального (ОФС «Извлекаемый объем лекарственных форм для парентерального применения»).

\***Абсорбция в ультрафиолетовой области спектра**. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение показателя «Абсорбция в ультрафиолетовой области спектра» в лекарственных препаратах для парентерального применения в полимерной упаковке».

**\*Восстанавливающие вещества.** Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение показателя «Восстанавливающие вещества» в лекарственных препаратах для парентерального применения в полимерной упаковке».

**\*Гемолитически действующие вещества**. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение показателя «Гемолитически действующие вещества» в лекарственных препаратах для парентерального применения в полимерной упаковке».

**Бактериальные эндотоксины.** Не более 0,6 ЕЭ на 1 мл препарата. (ОФС «Бактериальные эндотоксины»).

**\*\*Аномальная токсичность**. Препарат должен быть нетоксичным. (ОФС «Аномальная токсичность»). Тест-доза – 0,5 мл препарата на мышь, вводят внутривенно со скоростью 0,1 мл/с. Срок наблюдения 48 ч.

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

**Количественное определение**

1**. Натрий-ион.** Определение проводят методом атомно-эмиссионной спектрометрии (ОФС «Атомно-эмиссионная спектрометрия»).

*Раствор-модификатор.* В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 2,0 г лантана(III) хлорида гептагидрата (LaCl3·7H2O) и 2,0 г цезия хлорида (CsCl), растворяют в воде, прибавляют 4 мл азотной кислоты концентрированный, доводят объем раствора водой до метки.

*Стандартный раствор натрий-иона 1,70 ммоль/л.* 9,9353 г натрия хлорида (NaCl) помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, растворяют в воде и доводят объем раствора водой до метки.

10,0 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 1000 мл и доводят объем раствора водой до метки.

*Стандартные растворы натрий-иона 0,102 ммоль/л; 0,204 ммоль/л; 0,306 ммоль/л; 0,408 ммоль/л.* В четыре мерные колбы вместимостью 50 мл помещают 3,00; 6,00; 9,00; 12,00 мл стандартного раствора натрий-иона 1,70 ммоль/л. Доводят объем раствора в каждой колбе раствором-модификатором до метки. Полученные растворы содержат 0,102; 0,204; 0,306; 0,408 ммоль/л натрий-иона соответственно для построения калибровочного графика. Растворы используют свежеприготовленными.

*Контрольный раствор.* Раствор-модификатор.

*Испытуемый раствор*. В мерную колбу вместимостью 500 мл помещают 1,0 мл препарата и доводят объем раствора раствором-модификатором до метки.

*Раствор для настройки прибора на максимальную эмиссию.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 25,0 мл стандартного раствора 1,70 ммоль/л натрий-иона и доводят объем раствора раствором-модификатором до метки.

*Условия измерений*

*Прибор*: атомно-эмиссионный спектрометр.

*Пламя*: воздух-ацетилен.

*Длина волны*: 589,0 нм

Измеряют эмиссию стандартных и контрольного растворов и строят калибровочный график зависимости эмиссии от концентрации натрий-иона, откладывая на оси ординат значения эмиссии, на оси абсцисс – концентрацию натрий-иона в стандартных растворах в ммоль/л. Значения эмиссии устанавливают по среднеарифметическим результатам трех измерений каждого стандартного раствора натрий-иона за вычетом среднеарифметического трех измерений контрольного раствора.

Измеряют эмиссию испытуемого раствора и по калибровочному графику определяют содержание натрия в препарате в ммоль/л.

Содержание натрий-иона в препарате в ммоль/л (Х) вычисляют по формуле:

$$X= \frac{С ∙500 }{ 1 } ,$$

где: $С$ – содержание натрий-иона в испытуемом растворе, найденное по калибровочному графику, ммоль/л.

**2. Калий-ион.** Определение проводят методом атомно-эмиссионной спектрометрии (ОФС «Атомно-эмиссионная спектрометрия»).

*Раствор-модификатор.* В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 1,0 г цезия хлорида (CsCl), растворяют в небольшом количестве воды, прибавляют 4 мл азотной кислоты концентрированный, доводят объем раствора водой до метки.

*Стандартный раствор калий-иона 31,0 ммоль/л. 2,3112* г калия хлорида (КCl) помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, растворяют в воде и доводят объем раствора водой до метки.

*Стандартные растворы калий-иона 26,3 мкмоль/л; 51,2 мкмоль/л; 100,8 мкмоль/л; 155,0 мкмоль/л.* В четыре мерные колбы вместимостью 100 мл помещают 0,085; 0,165; 0,325; 0,500 мл стандартного раствора калий-иона 31,0 ммоль/л. Доводят объем раствора в каждой колбе раствором-модификатором до метки. Полученные растворы содержат 26,3; 51,2; 100,8; 155,0 мкмоль/л калий-иона для построения калибровочного графика. Растворы используют свежеприготовленными.

*Контрольный раствор.* Раствор-модификатор.

*Испытуемый раствор*. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 2,0 мл препарата и доводят объем раствора раствором-модификатором до метки.

*Раствор для настройки прибора на максимальную эмиссию.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 0,520 мл стандартного раствора 1,70 ммоль/л калий-иона и доводят объем раствора раствором-модификатором до метки.

*Условия измерений*

*Прибор*: атомно-эмиссионный спектрометр.

*Пламя*: воздух-ацетилен.

*Длина волны*: 766,5 нм

Измеряют эмиссию стандартных растворов и строят калибровочный график зависимости эмиссии от концентрации калий-иона, откладывая на оси ординат значения эмиссии, на оси абсцисс – концентрацию калий-иона в стандартных растворах в мкмоль/л. Значения эмиссии устанавливают по среднеарифметическим результатам трех измерений каждого стандартного раствора калий-иона за вычетом среднеарифметического трех измерений контрольного раствора.

Измеряют эмиссию испытуемого раствора и по калибровочному графику определяют содержание калия в препарате в мкмоль/л.

Содержание калий-иона в препарате в ммоль/л (Х) вычисляют по формуле:

$$X= \frac{С ·100 }{ 2·1000 } ,$$

где: $С$ – содержание калий-иона в испытуемом растворе, найденное по калибровочному графику, мкмоль/л;

 1000 – коэффициент пересчета из мкмоль/л в ммоль/л.

**3. Кальций-ион.** Определение проводят методом атомно-абсорбционной спектрометрии (ОФС «Атомно-абсорбционная спектрометрия»).

*Раствор-модификатор.* В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 3,72 г натрия эдетата, растворяют в воде, прибавляют 0, 40 г натрия гидроксида и доводят объем раствора водой до метки.

*Стандартный раствор кальций-иона 100,0 мг/л.* 3,6681 г кальция хлорида дигидрата (CaCl2·2H2O), помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, растворяют в воде и доводят объем раствора водой до метки.

5,0 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 50,0 мл и доводят объем раствора водой до метки.

*Стандартные растворы кальций-иона 24,95 мкмоль/л; 49,90 мкмоль/л; 74,85 мкмоль/л; 99,80 мкмоль/л*. В четыре мерные колбы вместимостью 100 мл помещают 1,00; 2,00; 3,00; 4,00 мл стандартного раствора кальций-иона 100 мг/л. Доводят объем раствора в каждой колбе раствором-модификатором до метки. Полученные растворы содержат 24,95; 49,90; 74,85; 99,80 мкмоль/л кальций-иона соответственно для построения калибровочного графика. Растворы используют свежеприготовленными.

*Контрольный раствор.* Раствор-модификатор.

*Испытуемый раствор*. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 2,0 мл препарата и доводят объем раствора раствором-модификатором до метки.

*Условия измерений*

*Прибор*: атомно-абсорбционный спектрометр.

*Пламя:* воздух-ацетилен.

*Длина волны*: 422,7 нм.

Измеряют значение абсорбции стандартных растворов и строят калибровочный график зависимости абсорбции от концентрации кальций-иона, откладывая на оси ординат значения абсорбции, на оси абсцисс – концентрацию кальций-иона в стандартных растворах в мкмоль/л. Значения абсорбции устанавливают по среднеарифметическим результатам трех измерений каждого стандартного раствора кальций-иона за вычетом среднеарифметического трех измерений контрольного раствора.

Измеряют значение абсорбции испытуемого раствора и по калибровочному графику определяют содержание кальций-иона в препарате в мкмоль/л.

Содержание кальций-иона в препарате в ммоль/л (Х) вычисляют по формуле:

$$X= \frac{С ·100 }{ 2·1000 } ,$$

где: $С$ – содержание кальций-иона в испытуемом растворе, найденное по калибровочному графику, мкмоль/л;

 1000 – коэффициент пересчета из мкмоль/л в ммоль/л.

**4. Магний-ион.** Определение проводят методом атомно-абсорбционной спектрометрии (ОФС «Атомно-абсорбционная спектрометрия»).

*Раствор-модификатор.* В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 6,0 г лантана(III) хлорида гептагидрата (LaCl3·7H2O) и 2,0 г цезия хлорида (CsCl), растворяют в воде, прибавляют 5 мл азотной кислоты концентрированный, доводят объем раствора водой до метки.

*Стандартный раствор магний-иона 1,03ммоль/л.* 209,4 мг магния хлорида гексагидрата (MgCl2·6H2O), помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, растворяют в воде и доводят объем раствора водой до метки.

*Стандартные растворы* *магний-иона. 0,0103 ммоль/л 0,0206 ммоль/л; 0,0309 ммоль/л; 0,0412 ммоль/л.* В четыре мерные колбы вместимостью 100 мл помещают 1,00; 2,00; 3,00; 4,00 мл стандартного раствора магний-иона 1,03 ммоль/л. Доводят объем раствора в каждой колбе раствором-модификатором до метки. Полученные растворы содержат 0,0103; 0,0206; 0,0309; 0,0412 ммоль/л магний-иона соответственно для построения калибровочного графика. Растворы используют свежеприготовленными.

*Контрольный раствор.* Раствор-модификатор.

*Испытуемый раствор*. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 2,0 мл препарата и доводят объем раствора раствором-модификатором до метки.

*Условия измерений*

*Прибор*: атомно-абсорбционный спектрометр.

*Пламя:* воздух-ацетилен.

*Длина волны*: 285,2 нм.

Измеряют значение абсорбции стандартных растворов и строят калибровочный график зависимости абсорбции от концентрации магний-иона, откладывая на оси ординат значения абсорбции, на оси абсцисс – концентрацию магний-иона в стандартных растворах в ммоль/л. Значения абсорбции устанавливают по среднеарифметическим результатам трех измерений каждого стандартного раствора магний-иона за вычетом среднеарифметического трех измерений контрольного раствора.

Измеряют значение абсорбции испытуемого раствора и по калибровочному графику определяют содержание магний-иона в препарате в ммоль/л.

Содержание магний-иона в препарате в ммоль/л (Х) вычисляют по формуле:

$$X= \frac{С ·100 }{ 2 } ,$$

где: $С$ – содержание магний-иона в испытуемом растворе, найденное по калибровочному графику, мкмоль/л.

**5. Хлорид-ион.** Определение проводят методом титриметрии (ОФС «Титриметрия (титриметрические методы анализа)». Аргентометрия).

*Раствор поливинилового спирта.* В 900 мл горячей воды растворяют 25 г поливинилового спирта, после охлаждения до комнатной температуры доводят объем раствора водой до 1000 мл.

5,0 мл препарата помещают в колбу и титруют 0,1 М раствором серебра нитрата до появления оранжево-желтого окрашивания, используя в качестве индикатора 0,2 мл калия хромата раствор 5 %.

*При использовании автоматического титратора.* 5,0 мл препарата помещают в колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 2 мл азотной кислоты концентрированной и 1 мл поливинилового спирта, перемешивают. Полученный раствор титруют 0,1 М раствором серебра нитрата до резкого изменения (скачка) потенциала индикаторного электрода.

Параллельно проводят контрольный опыт, используя вместо препарата воду.

Содержание хлорид-иона в препарате в ммоль/л (Х) вычисляют по формуле:

$$X= \frac{(V-V\_{0})∙K∙ 100 }{5} ,$$

где:

$V$ – объем 0,1 М раствора серебра нитрата пошедший на титрование препарата, мл;

$V\_{0}$ – объем 0,1 М раствора серебра нитрата, пошедший на титрование контрольного опыта, мл;

$K$ *–* поправочный коэффициент к титру 0,1 М раствора серебра нитрата;

100 *–* содержание хлорид-ионов, эквивалентное 1 мл 0,1 М раствора серебра нитрата, равное 100 ммоль/л;

5 – объем препарата, взятый для анализа, мл.

**6. Ацетат-ион.** Определение проводят методом спектрофотометрии (ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях») с использованием ферментного набора.

*Испытуемый раствор*. В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 1,0 мл препарата и доводят объем раствора водой до метки.

*Стандартный раствор ацетат-иона.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают около 0,34 г (точная навеска) натрия ацетата тригидрата, растворяют в воде и доводят объем раствора водой до метки.

2,0 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят объем раствора водой до метки.

*Реактив 1.* *Буферный раствор рН 8,4.* Раствор, содержащий триэтаноламиновый буферный раствор (рН около8,4), L- яблочную кислоту (около 4мг /мл), магния хлорида гексагидрата (около 2мг/мл).

Хранить при температуре 2-8 °С, перед использованием выдержать при температуре 20-25 °С, использовать неразбавленным.

*Реактив 2*. Лиофилизат, содержащий около 175 мг аденозин-5-трифосфата; около 18 мг коэнзима А; около 86 мг β-никотинамидадениндинуклеотида (НАДН).

Хранить при температуре 2-8 °С в течение 28 дней или при температуре от -15 до -25 °С в течение 2мес. Перед использованием 280 мг реактива 2 растворить в 7 мл воды.

*Реактив  3.* Суспензия, содержащая L- малатгидрогеназу (около 1100 Е) и цитрат-синтазу (около 270 Е).

Хранить при температуре 2-8 °С, использовать неразбавленным.

*Реактив 4*. Лиофилизат с ацетил-коэнзимом А синтетазой (около 5 Е) в каждом из трех флаконов.

Хранить при температуре 2-8 °С. в течение 5 дней. Перед использованием к содержимому каждого из трех флаконов реактива 4 добавить 0,25 мл воды.

*Калибровка прибора.* Проводят двукратное измерение стандартного раствора ацетат-ионов. При проведении измерения используют 0,1 мл стандартного раствора.

В кюветы толщиной 1 см помещают испытуемый раствор и контрольный раствор. Растворы в пипетируют и обрабатывают в соответствии с таблицей 2, измеряя оптическую плотность спектрофотометрическим методом при длине волны 340 нм.

Таблица 2 – Схема проведения испытаний для количественного определения ацетат- иона

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Помещают в кюветы: | Контрольный раствор  | Испытуемый раствор |
| Реактив 1 | 1,000 мл | 1,000 мл |
| Раствор реактива 2 | 0,200 мл | 0,200 мл |
| Испытуемый раствор | - | 0,100 мл |
| Вода | 2,000 мл | 1,900 мл |
| Перемешивают, измеряют оптическую плотность растворов (А0) относительно воздуха, затем добавляют: |
| Реактив 3 | 0,010мл | 0,010мл |
| Перемешивают, через 3 мин измеряют оптическую плотность растворов (А1) относительно воздуха, затем добавляют: |
| Раствор реактива 4 | 0,020 мл | 0,020 мл |
| Перемешивают, после завершения реакции (около 10-15 мин) измеряют оптическую плотность растворов (А2) относительно воздуха.Если реакция не завершилась по окончании 15 мин, продолжают измерять оптическую площадь с интервалом в 2 мин до тех пор, пока оптическая плотность не перестанет изменяться в течение 2 мин. |

Вычисляют разность значений оптических плотностей (А1–А0) и (А2 – А0) для контрольного (холостого) и испытуемого растворов.

Рассчитываем значение ΔА по формуле:



 Содержание ацетат-ионов в препарате (С) в ммоль/л рассчитывают по формуле:

 

где:

V– общий объем раствора, равный 3,23 мл;

F– фактор разведения препарата;

– коэффициент поглощения НАДН (6,3 л/моль·см);

1– толщина кюветы, см;

v– объем испытуемого раствора (0,1 мл);

R – степень извлечения стандартного раствора ацетат-ионов, %.

Степень извлечения стандартного раствора (R) в % рассчитываем по формуле:

 ,

где:

Спракт – найденная концентрация ацетат-ионов в стандартном растворе, ммоль/л;

Стеор – теоретическая концентрация ацетат-ионов в стандартном растворе, ммоль/л.

Найденную концентрацию ацетат-ионов в стандартном растворе (Спракт) в ммоль/л рассчитывают по формуле:

 

где:

m– масса навески стандартного образца натрия ацетата тригидрата, мг;

Р– содержание натрия ацетата тригидрата в стандартном образце натрия ацетата тригидрата, %;

М – молярная масса натрия ацетата тригидрата, 136,08г/моль.

*Проверка пригодности системы.* Степень извлечения стандартного раствора (среднее значение) должна находиться в диапазоне от 92,9% до 100 %.

*Примечание.* При проведении испытания с готовым набором реактивов для ферментного определения ацетат-ионов, используют методику определения ацетат-ионов, указанную в инструкции производителя ферментного набора.

**7. Малат-ион.** Определение проводят методом спектрофотометрии (ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях») с использованием ферментного набора.

*Испытуемый раствор*. В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 1,0 мл препарата и доводят объем раствора водой до метки.

*Стандартный раствор малат-иона 6 ммоль/л.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают около 0,30 г (точная навеска) яблочной кислоты, растворяют в воде и доводят объем раствора водой до метки.

1 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 20 мл и доводят объем раствора водой до метки.

*Реактив 1.* Раствор, содержащий глицилглициновый буферный раствор (рН около 10,0) ; L-глутаминовую кислоту 0,01467г/мл.

Хранить при температуре 2-8 °С, перед использованием выдержать при температуре 20-25 °С, использовать неразбавленным.

*Реактив 2*. Лиофилизат β-никотинамидадениндинуклеотида (НАДН).

Хранить при температуре 2-8 °С в течение 21 дня или при температуре от -15 до -25 °С в течение 2мес. Перед использованием к 210 мг реактива 2 добавить 6 мл воды.

*Реактив 3.* Суспензия содержащая глутамат-оксалоацетат-трансаминазы. (около 160 Е).

Хранить при температуре 2-8 °С, использовать неразбавленным.

*Реактив 4*. Раствор, содержащий L-малатдегидрогеназу (около 2400 Е ).

Хранить при температуре 2-8 °С, использовать неразбавленным.

*Калибровка прибора.* Проводят двукратное измерение стандартного раствора малат-ионов. При проведении измерения используют 0,1 мл стандартного раствора.

В кюветы толщиной 1 см помещают испытуемый раствор и контрольный раствор. Растворы в пипетируют и обрабатывают в соответствии с таблицей 3, измеряя оптическую плотность спектрофотометрическим методом при длине волны 340 нм.

Таблица 3 – Схема проведения испытаний для количественного определения малат-ионов

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Помещают в кюветы: | Контрольный раствор  | Испытуемый раствор |
| Реактив 1 | 1,000 мл | 1,000 мл |
| Раствор реактива 2 | 0,200 мл | 0,200 мл |
| Реактив 3 | 0,010мл | 0,010мл |
| Испытуемый раствор | - | 0,100 мл |
| Вода | 1,000 мл | 0,900 мл |
| Перемешивают, через 3 мин измеряют оптическую плотность растворов (А1) относительно воздуха, затем добавляют: |
| Реактив 4 | 0,010 мл | 0,010 мл |
| Перемешивают, после завершения реакции (около 5-10 мин) измеряют оптическую плотность растворов (А2) относительно воздуха сразу один за другим |

Вычисляют разность значений оптической плотности (А2 – А1) для контрольного (холостого) и испытуемого растворов. Рассчитываем значение ΔАпо формуле:

 

 Содержание малат-ионов в препарате (С) в ммоль/л рассчитывают по формуле:

 

где:

V– общий объем раствора, равный 2,22 мл;

F– фактор разведения препарата;

– коэффициент поглощения НАДН (6,3 л/моль·см);

1– толщина кюветы, см;

v– объем испытуемого раствора (0,1 мл);

R – степень извлечения стандартного раствора малат-ионов, %.

Степень извлечения стандартного раствора (R) в % рассчитывают по формуле:

 ,

где:

Спракт – найденная концентрация малат-ионов в стандартном растворе, ммоль/л;

 Стеор – теоретическая концентрация малат-ионов в стандартном растворе, ммоль/л.

Найденную концентрацию малат-ионов в стандартном растворе (Спракт) в ммоль/л рассчитывают по формуле:

 

где:

m– масса навески стандартного образца L-яблочной кислоты, мг;

Р– содержание L-яблочной кислоты в стандартном образце L-яблочной кислоты, %;

М – молярная масса L-яблочной кислоты, 134,08г/моль.

*Проверка пригодности системы.* Степень извлечения стандартного раствора (среднее значение) должна находиться в диапазоне от 95,4% до 102,2 %.

*Примечание.* При проведении испытания с готовым набором реактивов для ферментного определения малат-ионов, используют методику определения малат-ионов, указанную в инструкции производителя ферментного набора.

**Хранение**. При температуре не выше 25 °С.

\*Контроль по показателям качества «Абсорбция в ультрафиолетовой области спектра», «Восстанавливающие вещества», «Гемолитически действующие вещества» проводят для препарата в полимерной упаковке при фармацевтической разработке и при изучении его стабильности.

\*\* Контроль по показателю «Аномальная токсичность» проводят для препарата в полимерной упаковке.