**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |
| --- |
|  |

|  |  |
| --- | --- |
| **Аланин + Аргинин + Валин + Гистидин +**  **+ Глицин + Изолейцин + Лейцин + Лизин +**  **+ Метионин + Пролин + Серин + Тирозин +**  **+ Треонин + Триптофан + Фенилаланин +**  **+ Ацетилцистеин + Ацетилтирозин,**  **раствор для инфузий** | **ФС** |
| **Аминокислоты для парентерального питания, раствор для инфузий** |  |
| **Alaninum + Argininum + Valinum + Histidinum + Glycinum + Isoleucinum + Leucinum + Lysinum + Methioninum + Prolinum + Serinum + Tyrosinum + Threoninum + Tryptophanum + Phenylalaninum + Acetylcysteinum + Acetyltyrosinum, solution pro infusionibus** | **Вводится впервые** |

|  |
| --- |
|  |

Настоящая фармакопейная статья распространяется на группу лекарственных препаратов аминокислот для парентерального питания в форме растворов для инфузий. Препараты должны соответствовать требованиям ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения», предъявляемым к инфузионным лекарственным средствам, и ниже приведённым требованиям.

Действующими веществами препаратов является смесь аминокислот, перечень и содержание которых (в 1000 мл раствора) приведены в таблице.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Действую  щие  вещества | Концентрации действующих веществ | Действую  щие  вещества | Концентрации действующих веществ |
| *Аминокислоты (г/л)* | | | |
| Аланин | от 4,1 до 27,5 | Метионин | от 0,9 до 4,8 |
| Аргинин | от 4,1 до 22,0 | Пролин | от 2,8 до 18,7 |
| Валин | от 2,9 до 11,1 | Серин | от 2,0 до 10,6 |
| Гистидин | от 1,4 до 10,3 | Тирозин | от 0,0 до 0,63 |
| Глицин | от 2,3 до 20,4 | Треонин | от 2,0 до 9,5 |
| Изолейцин | от 2,3 до 11,5 | Триптофан | от 0,6 до 3,2 |
| Лейцин | от 3,5 до 14,4 | Фенилаланин | от 0,7 до 6,1 |
| Лизин / Лизина ацетат | от 0,0 до 12,6 | Ацетилцистеин | от 0,0 до 0,9 |
| Ацетилтирозин | от 0,0 до 5,5 |

Содержание действующих веществ в препаратах должно быть не менее 90,0 % и не более 110,0 % от заявленного количества.

В препараты для парентерального питания к смеси аминокислот могут быть добавлены сульфокислоты (таурин от 0,0 до 2,2 г/л или другие), органические кислоты (L-яблочная кислота или другие) и/или дипептиды (глицилтирозин или другие).

**Описание.** Содержание раздела приводится в соответствии с требованиями ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения».

**Подлинность.** *Аминокислоты*: аланин, аргинин, валин, гистидин, глицин, изолейцин, лейцин, лизин, метионин, пролин, серин, треонин, а также ароматические аминокислоты: тирозин, триптофан, фенилаланин, ацетилтирозин - для установления подлинности препарата идентифицируют методом ВЭЖХ в соответствии с ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография» или аминокислотным анализом в соответствии с ОФС «Аминокислотный анализ» (раздел «Количественное определение»). Времена удерживания производных аминокислот на хроматограммах стандартного и испытуемого растворов должны совпадать.

Ацетилцистеин *и триптофан* идентифицируют методом спектрофотометрии в соответствии с ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях» (раздел «Количественное определение») или другим валидированным методом.

Максимумы поглощения испытуемого и стандартного растворов производных ацетилцистеина, образующихся в результате взаимодействия ацетилцистеина с 2,2-динитро-5,5-дитиодибензойной кислотой, при 412 нм должны соответствовать (раздел «Количественное определение»).

Максимумы поглощения испытуемого и стандартного растворов производных триптофана, образующихся в результате реакции триптофана с п-диметиламинобензальдегидом, при 590 нм должны соответствовать (раздел «Количественное определение»).

Для идентификации ацетилцистеина и триптофана методом спектрофотометрии допускается использование других хромогенных реагентов.

**Прозрачность.** Должен выдерживать сравнение с эталоном I. Определение проводят в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей».

**Цветность.** Долженвыдерживать сравнение сэталонами цветности Y6 или ВY6. Определение проводят в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей».

**рН.** От 5,5 до 6,5. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия», метод 3.

**Механические включения.** Препарат должен выдерживать требования по содержанию механических включений.

Видимые механические включения должны соответствовать требованиям, указанным в ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах». Испытание проводят визуально.

Невидимые механические включения должны соответствовать требованиям, указанным в ОФС «Невидимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения». Определение проводят **счетно-фотометрическим методом.**

**Извлекаемый объем.** Не менее номинального. Определение проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем лекарственных форм для парентерального применения».

**Осмолярность.** От 530 до 1810 мОсм/л. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Осмолярность» (криоскопический метод).

**Общий азот.** От 7,7 до 27,0 г/л. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение азота в органических соединениях методом Къельдаля» или другим подходящим валидированным методом.

**Аномальная токсичность.**\* Должен быть нетоксичным. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Тест-доза 0,5 мл препарата на мышь, внутривенно со скоростью 0,1 мл/с (растворы 10 % и более разводят до концентрации 5 % водой для инъекций). Срок наблюдения – 48 ч.

\**Примечание.* Для препарата в полимерной упаковке.

**Бактериальные эндотоксины.** Не более 0,5 ЕЭ в 1 мл 0,5 % раствора препарата. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Бактериальные эндотоксины».

одержание аминокислот

Норма:

**Стерильность.** Препарат должен быть стерильным. Определение проводят методом мембранной фильтрации в соответствии с ОФС «Стерильность».

Количественное определение

***Аминокислоты*** в испытуемом препарате определяют методом аминокислотного анализа (I) в соответствии с ОФС «Аминокислотный анализ» и/или методом ВЭЖХ (II) в соответствии с ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография».

Концентрации действующих веществ в препарате должны быть в пределах, указанных в таблице.

|  |  |
| --- | --- |
| Амино(сульфо)кислота | Концентрация, г/л |
| Аланин | от 4,1 до 27,5 |
| Аргинин | от 4,1 до 22,0 |
| Валин | от 2,9 до 11,1 |
| Гистидин | от 1,4 до 10,3 |
| Глицин | от 2,3 до 20,4 |
| Изолейцин | от 2,3 до 11,5 |
| Лейцин | от 3,5 до 14,4 |
| Лизин | от 0,0 до 12,6 |
| Лизина ацетат | от 0,0 до 12,6 |
| Метионин | от 0,9 до 4,8 |
| Пролин | от 2,8 до 18,7 |
| Серин | от 2,0 до 10,6 |
| Тирозин | от 0,0 до 0,63 |
| Ацетилтирозин | от 0,0 до 5,5 |
| Треонин | от 2,0 до 9,5 |
| Триптофан | от 0,6 до 3,2 |
| Фенилаланин | от 0,7 до 6,1 |
| Ацетилцистеин | от 0,0 до 0,9 |
| Таурин | от 0,0 до 2,2 |

***I Количественное определение аминокислот методом аминокислотного анализа***

Количественный аминокислотный анализ проводят методом ионообменной хроматографии с постколоночной дериватизацией аминокислот нингидрином или другим подходящим реагентом. При взаимодействии с нингидрином аминокислоты образуют окрашенные соединения, которые могут быть проанализированы фотометрически (570 или 440 нм (пролин)).

Содержание аминокислот определяют с помощью аминокислотного ана­лизатора.Разделение аминокислот на ионообменной колонке достигается подбором рН и ионной силы. Для улучшения разделения используют температурный градиент.

Содержание каждой аминокислоты в препарате (с учетом соответствующего разведения испытуемого препарата) вычисляют на основании времени удерживания и площадей пиков в сравнении со стандартным раствором смеси аминокислот с известной концентрацией.

*Нингидриновый реагент.* Поставляется готовым к использованию, состоит из двух компонентов, которые смешивают непосредственно перед исполь­зованием.

*Буферный раствор для разведения.* Используют буферный раствор на основе лития цитрата pH 2,2 ± 0,01. Для этого 18,8 г лития цитрата и 14,8 г лимонной кислоты растворяют примерно в 2000 мл воды. К полученному раствору добавляют 10 мл тиодиэтиленгликоля и 11 мл хлористоводород­ной кислоты концентрированной. Точное значение pH раствора устанавливают потенциометрически путем добав­ления хлористоводородной ки­слоты концентрированной. После установления точного значения pH объем буферного раствора доводят в мерной колбе на 2000 мл водой до метки и фильтруют.

*Буферные растворы для элюции*

Используют буферные растворы на основе лития цитрата либо другие подходящие буферные системы.

*Буфер А (Li-А) pH 2,75:*

- лития цитрат - 9,4 г;

- хлористоводородная кислота концентрированная - 5,0 мл;

- кислота лимонная -7,4 г;

- метанол - 60 мл;

- вода - до 1 000 мл.

*Буфер В (Li-В ) pH 3,00:*

- лития цитрат -11,3 г

- хлористоводородная кислота концентрированная - 6,0 мл

- лимонная кислота - 6,0 г

- метанол - 50 мл

- вода - до 1 000 мл.

*Буфер С (Li-С) pH 3,55:*

- лития цитрат -16,9 г

- хлористоводородная кислота концентрированная - 8,0 мл

- лимонная кислота -1,8 г

- вода - до 1 000 мл.

*Испытуемый раствор*

*Разведение 1.* 4 мл инфузионного раствора разводят водой до 25 мл.0,5 мл полученного раствора и 1 мл раствора внутреннего стандарта дово­дят до 100 мл буферным раствором для разведения и используют для анализа.

*Разведение 2 (для определения таурина).* 1,5 мл инфузионного раствора и 1,5 мл раствора внутреннего стандарта доводят до 100 мл буферным раствором для разведения и исполь­зуют для анализа.

*Стандартный раствор*

*Основной раствор 1.* Точные навески стандартных образцов (СО) аминокислот, как указано ниже в таблице, растворяют в 40 мл хлористо­водородной кислоты раствора 1 М, после чего доводят объем до 50 мл буферным раствором для разведения.

|  |  |
| --- | --- |
| Аминокислота | Количество, мг |
| Аланин | 465,0 |
| Аргинин моногидрохлорид | 453,6 |
| Валин | 405,1 |
| Гистидин моногидрохлорид  х Н2О | 321,4 |
| Глицин | 207,5 |
| Изолейцин | 400,0 |
| Лейцин | 650,0 |
| Лизин моногидрохлорид | 531,6 |
| Метионин | 156,0 |
| Пролин | 485,5 |
| Серин | 373,5 |
| Треонин | 220,0 |
| Фенилаланин | 187,5 |

*Рабочий стандартный раствор 1.* 6,0 мл основного раствора 1 доводят до 10 мл водой, отби­рают 4 мл и доводят до 25 мл водой. 0,5 мл полученного раствора и 1,0 мл раствора внутреннего стандарта доводят до 100 мл буфер­ным раствором для разведения. При этом получают следующие концентрации аминокислот в рабочем стандартном растворе 1 (*Cst*, мг/л): аланин - 4,446; аргинин - 3,600; валин - 4,320; гистидин - 2,285; глицин - 1,992; изолейцин - 3,840; лейцин - 6,240; лизин - 4,084 (соответствует 5,760 мг/л лизина ацетата); метионин - 1,4976; пролин - 4,661; серин - 3,682; треонин - 2,112; фенилаланин - 1,800.

*Основной раствор 2.* Точную навеску стандартного образца (СО) таурина 125,2 мг растворяют в буферном раство­ре для разведения и доводят им объем до 200 мл.

*Рабочий стандартный раствор 2.* 0,5 мл основного раствора 2 и 1,0 мл раствора внутреннего стандарта доводят до 100 мл буферным раствором для разведения. При этом получают концентрацию таурина (*Cst*) в рабочем стандартном растворе 2 - 3,13 мг/л.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка\*  Скорость потока  Температура  Градиент температуры  Объем пробы  Установка фотометра  Метод интеграции | 125 x 4,0 мм; ионообменная смола сильнокислотная  Подвижная фаза – буферные растворы на основе лития цитрата с возрастающим градиентом значения pH  Буферного раствора - 20 мл/ч;  Реагента - 10 мл/ч  Температурный градиент от 38 до 80 °С  0,80 °С/мин  50 мкл  Е = 1,0  По внутреннему стандарту |

\*Допускается использовать другую, аналогичную колонку при соблюдении условий испытания пригодности хроматографической системы.

*Пригодность хроматографической системы*

Хроматографическая система считается пригодной, если для раствора для проверки пригодности хроматографической системы выполняются следующие условия:

- разрешение *(RS)* между пиками лейцина и изолейцина должно составлять не менее 1,2;

- разрешение *(RS)* между пиками аланина и глицина должно составлять не менее 1,2;

- фактор асимметрии пика *(AS)* аргинина должен быть от 0,8 до 1,5;

- относительное стандартное отклонение площадей пиков для каждой аминокислоты должно составлять не более 2,0 % (6 введений).

*Учет результатов*

Содержание аминокислот (*X*, г/л) рассчитывают по формуле:

где

*Spr* - площадь пика образца препарата;

*Sst* - площадь пика стандарта;

*Cst* - концентрация стандарта;

*F* - коэффициент разведения;

*Ka* - фактор конверсии (для фиксированной шкалы или для конверсии мг в г);

*Siss* - площадь пика внутреннего стандарта для стандарта;

*Sisp* - площадь пика внутреннего стандарта для образца.

***II Количественное определение аминокислот методом ВЭЖХ***

**Способ 1**

Количественное определение аминокислот **(**аланин, аргинин, валин, гистидин, глицин, изолейцин, лейцин, лизин, метионин, пролин, серин, таурин, тирозин, треонин, триптофан, фенилаланин**)** проводят методом ВЭЖХ с использованием внутренних стандартов.

Аминокислоты, за исключением пролина, определяют в виде поглощающих УФ свет производных, полученных методом предколоночной дериватизации свободных аминокислот о-фталевым альдегидом (ОФА) или другим подходящим реагентом.

Пролин определяют в виде поглощающих УФ свет производных, полученных методом доколоночной дериватизации при реакции с 9-флуоренилметилкарбонил хлоридом (ФМКХ, готовый реагент для аминокислотного анализа) или другим подходящим реагентом.

Содержание аминокислот определяют методом внутренних стандартов. Используют два внутренних стандарта: саркозин - для определения пролина, L-норвалин - для определения всех других аминокислот.

*Испытуемые растворы*

1. *Раствор для инфузий 5 %.* 2,0 мл препарата помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят объем раствора водой до метки. 9,0 мл полученного раствора смешивают с 1,0 мл раствора внутренних стандартов.
2. *Растворы для инфузий 10 и 15 %.* 1,0 мл препарата помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят объем раствора водой до метки. 9,0 мл полученного раствора смешивают с 1,0 мл раствора внутренних стандартов.

*ОФА реагент.* К 1 мл боратного буферного раствора pH 10,4 ± 0,1

добавляют 20 мкл метанола, 10 мг ОФА и 10 мкл 3-меркаптопропионовой кислоты, перемешивают, переносят во флакон и укупоривают. Срок годности реагента при (4 ± 2) оС не более 14 сут.

*Раствор внутренних стандартов.* Около 58,6 мг L-норвалина, около 44,6 мг саркозина помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, добавляют 50 мл хлористоводородной кислоты раствора 0,1 М. Содержимое колбы перемешивают до полного растворения навесок. Объем полученного раствора доводят водой до метки и перемешивают.

*Стандартные растворы L-триптофана, L-тирозина и таурина.*  Точные навески стандартных образцов (СО) аминокислот, взятые в соответствии с нижеследующей таблицей, помещают в мерную колбу вместимостью 500 мл и добавляют 300 мл хлористоводородной кислоты раствора 0,1 М. Содержимое колбы перемешивают до полного растворения навесок аминокислот. Объем полученного раствора доводят водой до метки и перемешивают.

Для анализа раствора для инфузий 5 % готовят растворы № 1 и № 2; для раствора для инфузий 10 % готовят растворы № 3 и № 4; для раствора для инфузий 15 % готовят растворы № 5 и № 6.

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Наименование СО амино- кислоты | Стандартные растворы аминокислот | | | | | |
| Навеска, мг | | | | | |
| № 1 | № 2 | № 3 | № 4 | № 5 | № 6 |
| L-триптофан | 90,0 | 110,0 | 180,0 | 220,0 | 144,0 | 176,0 |
| L-тирозин | 18,0 | 22,0 | 36,0 | 44,0 | 36,0 | 44,0 |
| Таурин | 45,0 | 55,0 | 90,0 | 110,0 | 180,0 | 220,0 |

*Стандартные растворы аминокислот.* Точные навески СО аминокислот, взятые в соответствии с нижеследующей таблицей, помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл и добавляют 300 мл хлористоводородной кислоты раствора 0,1 М. Содержимое колбы перемешивают до полного растворения навесок аминокислот и добавляют по 50,0 мл стандартных растворов L-триптофана, L-тирозина и таурина (с соответствующим номером). Объем полученного раствора доводят водой до метки и перемешивают.

Для анализа раствора для инфузий 5 % готовят растворы № 1 и № 2; для раствора для инфузий 10 % готовят растворы № 3 и № 4; для раствора для инфузий 15 % готовят растворы № 5 и № 6.

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Наименование СО амино- кислоты | Стандартные растворы аминокислот | | | | | |
| Навеска, мг | | | | | |
| № 1 | № 2 | № 3 | № 4 | № 5 | № 6 |
| L-изолейцин | 22,50 | 27,50 | 45,00 | 55,00 | 46,80 | 57,20 |
| L-лейцин | 33,30 | 40,70 | 66,60 | 81,40 | 80,10 | 97,90 |
| L-лизина ацетат | 41,85 | 51,15 | 83,79 | 102,4 | 140,9 | 172,3 |
| L-метионин | 19,35 | 23,65 | 38,70 | 47,30 | 34,20 | 41,80 |
| L-фенил-аланин | 22,95 | 28,05 | 45,90 | 56,10 | 49,50 | 60,50 |
| L-треонин | 19,80 | 24,20 | 39,60 | 48,40 | 77,40 | 94,60 |
| L-валин | 27,90 | 34,10 | 55,80 | 68,20 | 49,50 | 60,50 |
| L-аргинин | 54,00 | 66,00 | 108,0 | 132,0 | 180,0 | 220,0 |
| L-гистидин | 13,50 | 16,50 | 27,00 | 33,00 | 65,70 | 80,30 |
| L-аланин | 63,00 | 77,00 | 36,00 | 44,00 | 225,0 | 275,0 |
| Глицин | 49,50 | 60,50 | 99,00 | 121,0 | 166,5 | 203,5 |
| L-пролин | 50,40 | 61,60 | 100,8 | 123,2 | 153,0 | 187,0 |
| L-серин | 29,25 | 35,75 | 58,50 | 71,50 | 86,40 | 105,6 |

*Калибровочные растворы*

1. *Для раствора для инфузий 5 %.* 9,0 мл стандартного раствора аминокислот № 1 смешивают с 1,0 мл раствора внутренних стандартов (калибровочный раствор 1). 9,0 мл стандартного раствора аминокислот № 2 смешивают с 1,0 мл раствора внутренних стандартов (калибровочный раствор 2).
2. *Для раствора для инфузий 10 %.* 9,0 мл стандартного раствора аминокислот № 3 смешивают с 1,0 мл раствора внутренних стандартов (калибровочный раствор 3). 9,0 мл стандартного раствора аминокислот № 4 смешивают с 1,0 мл раствора внутренних стандартов (калибровочный раствор 4).
3. *Для раствора для инфузий 15 %.* 9,0 мл стандартного раствора аминокислот № 5 смешивают с 1,0 мл раствора внутренних стандартов (калибровочный раствор 5). 9,0 мл стандартного раствора аминокислот № 6 смешивают с 1,0 мл раствора внутренних стандартов (калибровочный раствор 6).

Концентрацию L-триптофана, L-тирозина и таурина (*С*, мг/мл) в калибровочных растворах вычисляют по формуле:

*C = a ∙ P ∙ 9 ∙ 10-7*, где

*а* - навеска СО соответствующей аминокислоты, взятая для приготовления соответствующего стандартного раствора L-триптофана, L-тирозина и таурина, мг;

*Р* - содержание аминокислоты в соответствующем стандартном образце, %.

Концентрацию других аминокислот (*С*, мг/мл), кроме L-лизина, в калибровочных растворах вычисляют по формуле:

*C = a ∙ P ∙ 9 ∙ 10-6*, где

*а* - навеска СО соответствующей аминокислоты, взятая для приготовления соответствующего стандартного раствора аминокислот, мг;

*Р* - содержание аминокислоты в соответствующем стандартном образце, %.

Концентрацию L-лизина (*С*, мг/мл) в калибровочных растворах вычисляют по формуле:

*C = a ∙ P ∙ 9 ∙ 0,709 ∙ 10-7*, где

*а* - навеска СО L-лизина ацетата, взятая для приготовления соответствующего стандартного раствора аминокислот, мг;

*Р* - содержание L-лизина ацетата в СО L-лизина ацетата, %.

*0,709* - коэффициент пересчета массы L-лизина ацетата на массу L-лизина, г ∙ моль-1/г ∙ моль-1.

Концентрацию саркозина и L-норвалина (*С*, мг/мл) в калибровочных растворах вычисляют по формуле:

*C = a ∙ 10-4*, где

*а* - навеска СО соответствующей аминокислоты, взятая для приготовления раствора внутренних стандартов, мг.

*Элюент А.* 4,42 г натрия ацетата помещают в мерный цилиндр вместимостью 500 мл, добавляют 500 мл воды, 0,090 мл триэтиламина. Содержимое колбы перемешивают до полного растворения навески натрия ацетата. С помощью уксусной кислоты ледяной pH раствора устанавливают равным 7,2 ± 0,1. К полученному раствору добавляют 1,5 мл тетрагидрофурана (нестабилизированного) и перемешивают. Перед применением элюент А фильтруют и дегазируют. Раствор может храниться при (4 ± 2) оС в течение 7 сут.

*Элюент Б.* 1,36 г натрия ацетата помещают в мерный цилиндр вместимостью 500 мл, добавляют 100 мл воды. Содержимое колбы перемешивают до полного растворения навески натрия ацетата. С помощью уксусной кислоты ледяной pH раствора устанавливают равным 7,2 ± 0,1. Добавляют 200 мл метанола и 200 мл ацетонитрила. Перед применением элюент Б фильтруют и дегазируют. Раствор можно хранить при (4 ± 2) оС в течение 21 сут.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка\*  Температура колонки  Детектор  Объем пробы | 200 x 2,1 мм; силикагель октадецилсилильный для хроматографии, 5 мкм  40 °С  Спектрофотометрический детектор:  338 нм – детектирование пиков производных аминокислот, кроме пролина и саркозина;  262 нм – детектирование пиков производных пролина и саркозина  1,0 мкл |

\*Допускается использовать другие аналогичные хроматографические колонки с равноценными сорбентами при соблюдении условий испытания пригодности хроматографической системы.

Перед началом определения колонку промывают в изократическом режиме исходной смесью элюентов А и Б до формирования стабильной базовой линии - около 4 мин.

Элюирование осуществляют смесью элюентов А и Б в режиме программирования состава подвижной фазы и скорости потока в соответствии со следующей таблицей.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Время,  мин | Элюент А,  % | Элюент Б,  % | Скорость потока, мл/мин |
| 0,0 | 100,0 | 0,0 | 0,45 |
| 16,5 | 40,0 | 60,0 | 0,45 |
| 18,0 | 40,0 | 60,0 | 0,45 |
| 21,0 | 0,0 | 100,0 | 0,45 |
| 21,1 | 0,0 | 100,0 | 0,45 |
| 23,5 | 0,0 | 100,0 | 0,80 |
| 28,9 | 0,0 | 100,0 | 0,80 |
| 29,0 | 0,0 | 100,0 | 0,45 |
| 35,0 | 100,0 | 0,0 | 0,45 |

Последовательно в колонку хроматографа вводят пробы соответствующих калибровочных и испытуемых растворов, получают не менее трех хроматограмм для каждого из них.

Относительное стандартное отклонение отношения площади пика определяемой аминокислоты к площади пика соответствующего внутреннего стандарта в серии хроматограмм каждого калибровочного и испытуемого раствора должно быть не более 1,0 %.

Времена удерживания производных аминокислот могут изменяться в определенных пределах при различных условиях хроматографирования. Однако, порядок элюирования производных аминокислот практически не меняется: серин, гистидин, глицин, треонин, аргинин, аланин, таурин, тирозин, валин, метионин, норвалин, триптофан, фенилаланин, изолейцин, лейцин, лизин, саркозин, пролин.

*Пригодность хроматографической системы*

В колонку хроматографа вводят пробу любого из калибровочных растворов, получают не менее трех хроматограмм. Коэффициент разделения между пиками любой пары аминокислот должен быть не менее 0,5. В случае необходимости изменяют соотношение основных элюентов подвижной фазы, добиваясь выполнения требований испытания на пригодность хроматографической системы. Если путем изменения состава подвижной фазы не удается достигнуть требуемых характеристик разделения, следует заменить колонку.

*Ход анализа и учет результатов*

На основании хроматограмм калибровочных растворов строят градуировочный график в координатах: отношение площади пика определяемой аминокислоты к площади пика соответствующего внутреннего стандарта (Y; ед.площади/ед.площади) **-** отношение концентрации определяемой аминокислоты к концентрации соответствующего внутреннего стандарта в калибровочном растворе (X; мг ∙ мл-1/мг ∙ мл-1). Начало координат включают в построение графика.

Коэффициент корреляции градуировочной прямой для всех определяемых аминокислот должен быть не менее 0,995.

На основании хроматограмм испытуемого раствора вычисляют среднее значение отношения площади пика определяемой аминокислоты к площади пика соответствующего внутреннего стандарта.

Используя соответствующий градуировочный график, определяют концентрацию каждой из аминокислот (*С*,мг/мл) в испытуемом растворе.

Содержание каждой аминокислоты (X, мг/мл (г/л)) в препарате вычисляют по формуле:

где

*V* - количество препарата, взятое для приготовления испытуемого раствора, мл.

**Способ 2**

Количественное определение аминокислот **(**аланин, аргинин, валин, гистидин, глицин, изолейцин, лейцин, лизин, метионин, пролин, серин, таурин, тирозин, треонин, триптофан, фенилаланин**)** проводят методом ВЭЖХ производных аминокислот после предколоночной дериватизации на разделительной колонке с обращенной фазой с использованием внешнего стандарта.

Аминокислоты, за исключением пролина, определяют в виде ОФА производных, полученных методом предколоночной дериватизации при реакции с о-фталевым альдегидом или другим подходящим для дериватизации реагентом.

Пролин определяют в виде поглощающих УФ свет производных, полученных методом предколоночной дериватизации аминокислоты 4-диметил-аминоазобензол-4’сульфонил хлоридом (ДАБС) или другим подходящим реагентом. Детектирование проводят спектрофотометрически (436 нм).

*Испытуемый раствор.* Точное количество препарата (около 1 мл) помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят водой до метки. Раствор может храниться при (4 ± 2) оС не более 7 сут.

*ОФА реагент 2.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 620 мг борной кислоты и 60 мл воды, доводят значение pH полученного раствора до 10,4 ± 0,1 натрия гидроксида раствором 1 М. Объём раствора доводят водой до метки. Приготовленный раствор хранят при (4 ± 2) оС в течение 1 месяца.

На 1 мл приготовленного раствора берут 10 мг ОФА и 40 мкл меркаптоэтанола, раствор перемешивают до полного растворения ОФА и хранят при (4 ± 2) оС в емкости с закрытой крышкой не более 7 сут.

*Внешний стандарт.* Внешним стандартом, используемым для калибровки хроматографической системы, а также проведения качественного и количественного анализа, является стандартный раствор аминокислот, соответствующий составу аминокислот препарата.

Стандартный раствор аминокислот. Точные навески СО аминокислот (соответствующие составу аминокислот препарата) количественно вносят в мерную колбу на 250 мл, добавляют 150 мл воды, перемешивают до полного растворения навесок и доводят водой до метки. Раствор может храниться при (4 ± 2) оС не более 7 сут.

*«Стоп-раствор».* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 27,2 г натрия ацетата и растворяют в 80 мл воды, после чего доводят раствор водой до метки. pH полученного раствора устанавливают равным 6,0 ± 0,1 уксусной кислотой разведенной 10 %. Раствор может храниться при (4 ± 2) оС не более 7 сут.

*Элюент А2.* 2,72г натрия ацетата помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, добавляют 900 мл воды и 4 мл 1,4-диоксана, перемешивают. Устанавливают pH раствора 7,2 ± 0,1 с помощью уксусной кислоты разведенной 10 % или натрия гидроксида раствора 1 М и доводят объем раствора водой до метки. Срок годности раствора при (4 ± 2) оС не более 7 сут.

*Элюент Б2.* 2,72г натрия ацетата помещают в мерную колбу на 250 мл и растворяют в 200 мл воды. Значение pH полученного раствора доводят до 7,2 ± 0,1 уксусной кислотой разведенной 10 % или натрия гидроксида раствором 1 М. Полученный раствор переносят в колбу вместимостью 1000 мл, добавляют 400 мл этанола, 400 мл ацетонитрила и перемешивают. Раствор может храниться при (4 ± 2) оС в течение 1 месяца.

*Процедура дериватизации*

20 мкл испытуемого раствора, стандартного раствора аминокислот или раствора индивидуальной аминокислоты переносят в коническую пробирку на 1,5 мл с крышкой, добавляют 100 мкл ОФА реагента 2, закрывают крышку и тщательно перемешивают в течение 3 мин (точно), добавляют 1 мл «стоп-раствора», закрывают крышку и снова перемешивают. Приготовленный раствор годен к введению в хроматограф в течение 3 - 5 мин после добавления «стоп-раствора».

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка\*  Температура колонки  Скорость потока  Детектор  Объем пробы | 250 х 4,6 мм; силикагель октадецилсилильный для хроматографии, 5 мкм  45 °С  1,5 мл/мин  Флуориметрический детектор: 338 нм  20 мкл |

\*Допускается использовать другую аналогичную колонку при соблюдении условий испытания пригодности хроматографической системы.

Перед началом определения колонку промывают в изократическом режиме исходной смесью элюентов А2 и Б2 до формирования стабильной базовой линии. Элюирование осуществляют смесью элюентов А2 и Б2 в градиентном режиме в соответствии со следующей таблицей.

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Время | 0 | 0,7 | 6,5 | 16 | 17 | 22 | 34,1 | 34,1 | 37,1 | 40 |
| А2, % | 100 | 100 | 78 | 79 | 65 | 66 | 25 | 0 | 0 | 100 |
| Б2, % | 0 | 0 | 22 | 21 | 35 | 34 | 75 | 100 | 100 | 0 |

Последовательно в колонку хроматографа вводят после предварительной дериватизации 20 мкл стандартного раствора аминокислот, затем 20 мкл раствора препарата для анализа, получают не менее трех хроматограмм для каждого из них.

Подлинность аминокислот в испытуемом растворе определяют по соответствию времени удерживания производных аминокислот на полученных хроматограммах стандартного и испытуемого растворов. Для количественного определения на хроматограммах определяют площадь пика, соответствующего каждой аминокислоте.

Порядок выхода аминокислот при анализе ОФА-производных: серин, гистидин, глицин, треонин, аргинин, аланин, валин, метионин, триптофан, изолейцин, фенилаланин, лейцин, лизин. Порядок выхода фенилаланина и изолейцина необходимо уточнять для конкретной колонки.

*Пригодность хроматографической системы*

Для каждой аминокислоты отдельно готовят стандартные растворы с концентрациями, соответствующими концентрациям в испытуемом препарате. Далее проводят дериватизацию аминокислот и анализируют их производные на хроматографе.

Время удерживания и площадь пика для каждого компонента стандартного раствора определяют не менее трех раз. Стандартное отклонение времен удерживания не должно превышать 2,0 %. В случае превышения, калибровку осуществляют не менее 6 раз до достижения необходимых параметров заданного стандартного отклонения.

Степень разделения между пиками должна быть не менее 0,8. В случае необходимости изменяют соотношение основных элюентов подвижной фазы, добиваясь выполнения требований испытания на пригодность хроматографической системы. Если путем изменения состава подвижной фазы не удается достигнуть требуемых характеристик разделения, следует заменить колонку.

Учет результатов

Содержание каждой аминокислоты (*Х*, г/л) препарата рассчитывают по формуле:

где

*Si* - среднее значение площади пика аминокислоты на хроматограмме раствора препарата;

*S0* **-** среднее значение площади пика аминокислоты на хроматограмме стандартного раствора;

*m0* **-** навеска аминокислоты, использованная при приготовлении

стандартного раствора, г;

*F* **-** коэффициент разведения препарата;

*V* **-** объем мерной колбы для приготовления стандартного раствора для

анализа, л.

Содержание лизина ацетата в препарате (*Хlys/ac*, г/л) вычисляют по формуле:

*Хlys/ac = Хlys/hydr ∙ 1, 1292,* где

*1,1292* - коэффициент пересчета лизина гидрохлорида в лизин ацетат.

Определение концентраций аминокислот можно проводить в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения подходящего типа.

***Ацетилтирозин****.*Количественное определение ацетилтирозинапроводят методом ВЭЖХ в соответствии с ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография».

*Испытуемый раствор.* 2,5 мл инфузионного раствора разводят водой до 100 мл в мерной колбе.

*Стандартный раствор N-ацетил L-тирозина.* Исходный раствор - 100 мг N-ацетил L-тирозина растворяют в 100 мл во­ды. 7 мл исходного раствора разводят водой до 100 мл в мерной колбе (*Cst* 70 мг/л).

*Элюент В.* Фосфатно-калиевый буферный раствор pH 4,0 ± 0,1 и метанол в соотношении 95 : 5.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка\* | 125 х 4,0 мм; силикагель октадецил-силильный для хроматографии, 5 мкм |
| Скорость потока | 1,0 мл/мин |
| Детектор | Спектрофотометрический: 280 нм |
| Объем пробы | 10 мкл |

\*Допускается использовать другую аналогичную колонку при соблюденииусловий испытания пригодности хроматографической системы.

Последовательно в колонку хроматографа вводят по 10 мкл стандартного и испытуемого растворов, получают не менее 6 хроматограмм для каждого из них. Относительное стандартное отклонение площадей пиков тирозина на повторных хроматограммах стандартного и испытуемого растворов должно быть не более 1,0 %.

Время удерживания пика ацетилтирозина составляет около 6,25 мин.

*Пригодность хроматографической системы*

В колонку хроматографа вводят 10 мкл стандартного раствора N-ацетил L-тирозина, получают не менее 6 хроматограмм. Относительное стандартное отклонение площадей пиков должно быть не более 2,0.

*Учет результатов*

Расчеты проводят с применением интегратора по методу внешнего стандарта. Содержание ацетилтирозина (*Xac/tyr*, г/л) в препарате вычисляют по формуле:

*Xac/tyr* где

*Spr* - площадь пика образца испытуемого раствора;

*Sst* - площадь пика стандартного раствора;

*Cst* - концентрация стандартного раствора, мг/л;

*F* – коэффициент разведения;

*К* - коэффициент пересчета концентрации.

***Ацетилцистеин.*** Количественное определение ацетилцистеина проводят методом спектрофотометрии в соответствии с ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях» или другим валидированным методом.

Одним из вариантов определения содержания ацетилцистеина является метод спектрофотометрии при 412 нм раствора производного, образующегося в результате взаимодействия ацетилцистеина с 2,2-динитро-5,5-дитиодибензойной кислотой. Возможно использование других подходящих реагентов, реагирующих с ацетилцистеином с образованием окрашенных соединений, содержание которых можно определять спектрофотометрически.

*Испытуемый раствор.* 10 мл испытуемого инфузионного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят водой до метки. Для испытаний используют 4 мл полученного раствора.

*Раствор 2,2 -динитро-5,5-дитиодибензойной кислоты.* Растворяют 119 мг 2,2 -динитро-5,5-дитиодибензойной кислоты в 50 мл эта­нола и доводят объем уксусной кислоты раствором 0,1 М до 100 мл. Раствор используют свежеприготовленным.

*Стандартный раствор* *N-ацетил-L-цистеина.* Растворяют 100 мг СО N-ацетил-L-цистеина в воде в мерной колбе на 200 мл (500 мг/л). Полученный раствор в количестве 8 мл переносят в мерную колбу на 100 мл и доводят водой (40 мг/л). Раствор используют свежеприготовленным.

*Проведение анализа и учет результатов*

Смешивают 4 мл испытуемого раствора (или стандартного раствора), 2 мл трис-гидрохлоридного буферного раствора pH 8,6 ± 0,1и 2 мл раствора 2,2-динитро-5,5-дитиодибензойной кислоты, после чего дово­дят объем смеси водой в мерной колбе до 20 мл. Оптическую плотность полученной смеси растворов измеряют через 3 мин при 412 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм (по сравнению с контролем **-** смесь растворов без испытуемого или стандартного раствора).

Содержание ацетилцистеина (*Хac/cyst*, г/л) вычисляют по формуле:

, где

*Apr* - значение поглощения испытуемого раствора;

*Ast* - значение поглощения стандартного раствора;

*Cst* - концентрация стандартного раствора, мг/л;

*F* - коэффициент разведения.

***Тирозин*** *(альтернативный метод).*Количественное определение тирозинапроводят методом ВЭЖХ в соответствии с ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография».

*Испытуемый раствор.* В качестве испытуемого раствора используют препарат без дополнительной пробоподготовки.

*Стандартные растворы* *L-тирозина*

Точные навески СО L-тирозина, взятые в соответствии с нижеследующей таблицей, помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и добавляют 70 мл хлористоводородной кислоты раствора 0,1 М. Содержимое колбы перемешивают до полного растворения навески. Объем полученного раствора доводят водой до метки.

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Стандартные растворы L-тирозина | | | | | |
| Навеска, мг | | | | | |
| № 1 | № 2 | № 3 | № 4 | № 5 | № 6 |
| 18,00 | 22,00 | 36,00 | 44,00 | 36,00 | 44,00 |

Для анализа раствора для инфузий 5 % готовят растворы № 1 и № 2; для раствора для инфузий 10 % готовят растворы № 3 и № 4; для раствора для инфузий 15 % готовят растворы № 5 и № 6.

Концентрацию L-тирозина (*С,* мг/мл) в стандартных растворах вычисляют по формуле:

*C = a · P · 10-4*, где

*а* - навеска СО L-тирозина, взятая для приготовления соответствующего стандартного раствора, мг;

*Р* - содержание аминокислоты в соответствующем стандартном образце, %.

*Элюент А3.* 2,76 г натрия ацетата помещают в мерный цилиндр вместимостью 1000 мл, добавляют 900 мл воды и перемешивают до полного растворения навески. С помощью уксусной кислоты ледяной pH раствора устанавливают равным 4,0 ± 0,1. Перед использованием элюент А3 фильтруют и дегазируют.

*Элюент Б3.* В качестве элюента Б3 используют ацетонитрил. Перед применением элюент Б3 фильтруют.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка\* | 100 х 4,6 мм; силикагель октадецил-силильный для хроматографии, 5 мкм |
| Температура колонки | 40 °C |
| Скорость потока | 1,0 мл/мин |
| Детектор | Спектрофотометрический:  - длина волны определения 275 нм с шириной спектральной линии 4 нм;  - длина волны сравнения 550 нм с шириной спектральной линии 100 нм |
| Объем пробы | 3,0 мкл |

\*Допускается использовать другую аналогичную колонку при соблюденииусловий испытания пригодности хроматографической системы.

Элюирование осуществляют смесью элюентов А3 и Б3 в градиентном режиме в соответствии с нижеприведенной таблицей.

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Время, мин | 0 | 3,0 | 3,5 | 8,5 | 9,0 |
| А3, % | 100 | 100 | 40 | 40 | 0 |
| В3, % | 0 | 0 | 60 | 60 | 100 |

Последовательно в колонку хроматографа вводят по 3,0 мкл стандартного и испытуемого растворов, получают не менее 6 хроматограмм для каждого из них. Относительное стандартное отклонение площадей пиков тирозина на повторных хроматограммах стандартного и испытуемого растворов должно быть не более 1,0 %.

Время удерживания пика тирозина составляет около 1,6 мин.

*Пригодность хроматографической системы*

В колонку хроматографа вводят 3,0 мкл стандартного раствора, получают не менее 6 хроматограмм. Число теоретических тарелок для пика тирозина должно быть не менее 3500. Относительное стандартное отклонение площадей пиков должно быть не более 2,0 %, фактор асимметрии пиков должен быть в пределах 0,8 - 1,5.

*Проведение анализа и учет результатов*

На основании хроматограмм стандартных растворов строят градуировочный график в координатах: площадь пика L-тирозина (Y; ед.площади/ед.площади) - концентрация L-тирозина в стандартном растворе (X; мг/мл). Начало координат включают в построение графика.

Коэффициент корреляции градуировочной прямой должен быть не менее 0,995. Используя соответствующий градуировочный график, определяют концентрацию тирозина (*С*, мг/мл) в испытуемом растворе.

Содержание тирозина (*Xtyr*, г/л) в препарате вычисляют по формуле:

*Хtyr = С · К*, где

*К* - коэффициент пересчета концентрации тирозина.

***Триптофан*** *(альтернативные методы).*Количественное определение триптофана проводят методом ВЭЖХ в соответствии с ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография», методом спектрофотометрии в соответствии с ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях» или другим валидированным методом.

***Метод ВЭЖХ.*** Количественное определение триптофана проводят методом обращенно-фазовой ВЭЖХ.

*Испытуемый раствор.* 4,0 мл инфузионного раствора разводят водой в мерной колбе до 250 мл, при не­обходимости фильтруют.

*Стандартный раствор L-триптофана.* Исходный стандартный раствор - 100 мг СО L-триптофана растворяют в воде в мерной колбе вместимостью 100 мл и доводят во­дой до метки. 2 мл исходного стандартного раствора разводят водой до 100 мл в мерной колбе (*Cst* 20 мг/л).

*Элюент В1.* Фосфатно-калиевый буферный раствор pH 4,0 ± 0,1 и метанол в соотношении 85 : 15.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка\* | 125 х 4,0 мм; силикагель октадецил-силильный для хроматографии, 5 мкм |
| Скорость потока | 1,0 мл/мин |
| Детектор | Спектрофотометрический: 280 нм |
| Объем пробы | 10 мкл |

\*Допускается использовать другую аналогичную колонку при соблюденииусловий испытания пригодности хроматографической системы.

Последовательно в колонку хроматографа вводят по 10 мкл стандартного и испытуемого растворов, получают не менее 6 хроматограмм для каждого из них. Относительное стандартное отклонение площадей пиков тирозина на повторных хроматограммах стандартного и испытуемого растворов должно быть не более 1,0 %.

Время удерживания пика триптофана составляет около 4,0 мин.

*Пригодность хроматографической системы*

В колонку хроматографа вводят 10 мкл стандартного раствора, получают не менее 6 хроматограмм. Относительное стандартное отклонение площадей пиков должно быть не более 2,0.

*Учет результатов*

Расчеты проводят с применением интегратора по методу внешнего стандарта. Содержание триптофана (*Xtrypt*, г/л) в препарате вычисляют по формуле:

*Xtrypt* , где

*Spr* - площадь пика образца испытуемого раствора;

*Sst* - площадь пика стандартного раствора;

*Cst* - концентрация стандартного раствора, мг/л;

*F* – коэффициент разведения;

*К* - коэффициент пересчета (мг в г).

***Метод спектрофотометрии.*** Количественное определение триптофана проводятметодом спектрофотометрии при 590 нм раствора производного, образующегося в результате реакции аминокислоты с п-диметиламинобензальдегидом.

Испытуемый раствор. 2,5 мл раствора для инфузий помещают в мерную колбу вместимостью 200 мл и доводят водой до метки.

*Натрия нитрита раствор 0,004 %.* 100 мг нитрита натрия растворяют в воде и доводят водой до 250 мл. 10 мл полученного раствора разбавляют водой до 100 мл. Раствор стабилен в темном месте в течение 2 ч.

*n-диметиламинобензальдегида раствор 0,3 % (в серной кислоте разведенной 70 %).* 300 мг n-диметиламинобензальдегида растворяют в 90 мл серной кислоты разведенной 70 %. Раствор используют свежеприготовленным.

Раствор стандартного образца *L-триптофана*. Взвешивают около 100 мг L-триптофана (точная навеска), помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в воде на ультразвуковой бане и доводят водой до метки. Полученный раствор в количестве 5,0 мл помещают в мерную колбу вместимостью 200 мл и доводят водой до метки.

*Проведение анализа и учёт результатов*

В две колбы Эрленмейера вместимостью 50 мл помещают по 2,0 мл натрия хлорида раствора 17,4 %и по 2,0 мл натрия гидроксида раствора 32 %. Затем в одну колбу добавляют 5,0 мл испытуемого раствора, во вторую - 5,0 мл стандартного раствора, и по 15,0 мл *п*-диметиламинобензальдегида раствора 0,3 % в каждую колбу. Колбы ос­тавляют стоять в темном месте в течение 60 мин. После этого добавляют по 2,0 мл нитрита натрия раствора 0,004 %и оставляют стоять в темном месте в течение 30 мин. Поглощение растворов измеряют при 590 нм в кювете c толщиной слоя 10 мм, используя воду в качестве раствора сравнения.

Количественное содержание триптофана (*Xtrypt*, г/л) рас­считывают по формуле:

где

*Аpr* - поглощение испытуемого раствора;

*Аst* - поглощение стандартного раствора;

*mо* - навеска стандартного образца L-триптофана, мг;

*Р* - чистота стандарта L-триптофана, мг/мг.

**Хранение.** В защищенном от света месте. Не замораживать.