**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |
| --- |
|  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **L-Метионин** |  | **ФС** |
| **Метионин** |  |  |
| **L-Methioninum** |  | **Взамен ВФС 42-601-92** |

|  |
| --- |
|  |

|  |  |
| --- | --- |
| (2*S*)-2-амино-4-(метилсульфанил)бутановая кислота | |
| Methionin - Methionine.svg | |
| C5H11NO2S | М.м. 149,2 |

Содержит не менее 99,0 % и не более 101,0 % L-метионина в пересчёте на сухое вещество.

**Описание.** Белый или почти белый кристаллический порошок или бесцветные кристаллы с характерным запахом.

**Растворимость.** Легко растворим в муравьиной кислоте и хлористово­дородной кислоте разведенной 7,3 %, растворим в воде, практически не рас­творим в спирте 96 %.

**Подлинность**

*1. ИК-спектрометрия.* ИК-спектр субстанции, снятый в диске с ка­лия бромидом (1,0 мг субстанции в 200 мг калия бромида), в области от 4000 до 400 см-1 по положению полос поглощения должен соответствовать спектру стандартного образца L-метионина (ОФС «Спектрометрия в инфракрасной области»).

*2. ТСХ.* Основное пятно на хроматограмме испытуемого раствора по поло­жению, окраске и величине должно соответствовать основному пятну на хроматограмме раствора стандартного образца L-метионина (ОФС «Тонкослойная хроматография»).

*Испытуемый раствор А.* 0,10 г субстанции помещают в мерную кол­бу вместимостью 10 мл, растворяют в хлористоводородной кислоте разве­денной 7,3 % и доводят объем раствора тем же растворителем до метки.

*Испытуемый раствор Б.* 1,0 мл испытуемого раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят объем раствора водой до метки.

*Раствор стандартного образца L-метионина.* 10 мг стандартного образца L-метионина помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в хлористоводородной кислоте 1 %, доводят объем раствора тем же растворителем до метки.

*Раствор сравнения.* 5,0 мл испытуемого раствора Б помещают в мерную колбу вместимостью 20 мл и доводят объем раствора водой до метки.

*Раствор для проверки пригодности хроматографической системы.* 10 мг стандартного образца L-метионина и 10 мг стандартного образца L-серина помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в хлори­стоводородной кислоте 1 % и доводят объем раствора тем же раство­рителем до метки.

*Нингидрина* *раствор 0,2 %*. 0,2 г нингидрина растворяют в смеси 3 мл уксусной кислоты ледяной и 97 мл ацетона.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Пластинка\*  Подвижная фаза  Объем пробы  Реагент для детекции | 10 x 15 см; ТСХ пластинка со слоем силикагеля  Бутанол – вода – уксусная кислота ледяная в соотношении 60 : 20 : 20 (об.)  5 мкл  Нингидрина раствор 0,2 % (в смеси растворителей уксусная кислота ледяная - ацетон в соотношении 3 : 97 (об.) |

*Пригодность хроматографической системы.* Хроматографическая система считается пригодной, если на хроматограмме раствора для проверки пригодности хроматографической системы наблюдается четкое деление двух пятен (ОФС «Хроматография»).

На линию старта хроматографической пластинки с силикагелем (или аналогичной) размером 10 x 15 см наносят по 5 мкл каждого раствора, дополнительно наносят 5 мкл раствори­теля (хлористоводородной кислоты разведенной 7,3 %). Пластинку с нане­сенными пробами высушивают на воздухе, помещают в камеру со смесью растворителей (об.): бутанол – вода – уксусная кислота ледяная (60 : 20 : 20). Хроматографируют вос­ходящим способом. Когда фронт растворителя пройдет около 80 - 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры и высушивают на воздухе. Затем пластинку опрыскивают нингидрина раствором 0,2 % и вы­держивают при (103 ± 2) °C в течение 15 мин, после чего сравнивают окраску пятен испытуемого и стандартного растворов.

На хроматограмме испытуемого раствора А, кроме основного пятна и пятна растворителя, допускается наличие дополнительных пятен, каждое из которых по совокупности величины и интенсивности окраски не должно превышать пятно на хроматограмме раствора сравнения.

Удельное вращение. Должно со­ставлять от + 22,5 до + 24,0 в пересчете на сухое вещество (ОФС «Поляриметрия»).

*Испытуемый раствор.* Около 1,0 г (точная навеска) субстанции растворяют в хлористоводородной кислоте 25 % и доводят объем раствора тем же растворителем до 50 мл.

**Светопропускаемость.** Должна быть не ме­нее 98 % (ОФС «Спектрофотометрия в УФ и видимой областях»). Светопропускаемость определяют для 2,5 % водного раствора субстанции при 430 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм (относительно воды).

**Прозрачность раствора.** Раствор, полученный при растворении 2,5 г субстанции в 100 мл воды (свобод­ной от углерода диоксида), должен быть прозрачным или выдерживать сравнение с эталоном I (ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей»).

**Цветность раствора.** Раствор, полученный при растворении 2,5 г субстанции в 100 мл воды (свобод­ной от углерода диоксида), должен быть бесцветным или выдерживать сравнение с эталоном В9 (ОФС «Степень окраски жидкостей»).

**рН.** От 5,5 до 6,5 (для 2,5 % водного раствора субстанции). Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Родственные примеси. Определение проводят методом ВЭЖХ в соответствии с ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография».

Все растворы используют свежеприготовленными, если не указано иначе.

*Подвижная фаза А (ПФА).* Вода - фосфорной кислоты раствор 0,2 М - ацетонитрил для хроматографии в объемном соотношении 87,0 : 12,5 : 0,5.

*Подвижная фаза Б (ПФБ).* Ацетонитрил для хроматографии - вода - фосфорной кислоты раствор 0,2 М в объемном соотношении 47,5 : 40,0 : 12,5.

*Испытуемый раствор.* 30 мг/мл (точная навеска субстанции в ПФА).

*Раствор сравнения.* 1,0 мл испытуемого раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят объем раствора ПФА до метки. 1,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл и доводят объем раствора ПФА до метки.

*Стандартный раствор* *L-метионина.* 30 мкг/мл (точная навеска стандартного образца L-метионина в ПФА).

*Стандартный раствор* *N-ацетил-D,L-метионина.* 60 мкг/мл (точная навеска стандартного образца N-ацетил-D,L-метионина в ПФА).

*Раствор для проверки пригодности хроматографической системы.* По 5 мг каждого из стандартных образцов L-метионина и L-метионин сульфоксида ((2*S*)-2-Амино-4-[(*RS*)-метилсульфинил]бутановая кислота) помещают в мерную кол­бу вместимостью 50 мл, растворяют в ПФА и доводят объем раствора тем же растворителем до метки.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка  Температура колонки  Скорость потока  Детектор  Объем пробы | 250 х 4,6 мм; силикагель октадецилсилильный эндкепированный для хроматографии (С18),  5 мкм  (30 ± 2) °С  1,0 мл/мин  УФ-детектор, 205 нм  50 мкл |

*Режим хроматографирования*

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Время, мин | ПФА, % | ПФБ, % |
| 0 - 6 | 100 | 0 |
| 6 - 50 | 100 → 0 | 0 → 100 |
| 50 - 60 | 0 | 100 |
| 60 - 70 | 100 | 0 |

*Относительное время удерживания пиков.* L-метионина сульфоксид – 0,5; L-метионин – 1,0 (около 6 мин); N-ацетил-D,L-метионин - 3,4.

*Пригодность хроматографической системы*. Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

– *разрешение (RS)* между пиками L-метионина и L-метионина сульфоксида на хроматограмме раствора для проверки пригодности хроматографической системы должно составлять не менее 5,0;

– *фактор асимметрии пика* *(AS)* L-метионина на хроматограммах раствора сравнения должен быть не более 2.

– *относительное стандартное отклонение* площади пика L-метионина должно быть не более 5,0 % (6 введений);

– *эффективность хроматографической колонки (N)*, рассчитанная по пику L-метионина на хроматограммах раствора сравнения должна составлять не менее 3000 теоретических тарелок.

*Допустимое содержание примесей.* На хроматограмме испытуемого раствора:

– площадь пика L-метионина сульфоксида (с учетом фактора отклика) не должна превышать площадь пика на хроматограмме раствора сравнения (не более 0,1%);

– площадь пика N-ацетил-D,L-метионина должна не более, чем в 2 раза превышать площадь пика на хроматограмме раствора сравнения (не более 0,2%);

– площадь пика любой единичной примеси не должна превышать площадь пика на хроматограмме раствора сравнения (не более 0,1%);

– сумма площадей всех пиков примесей должна не более, чем в 3 раза превышать площадь пика на хроматограмме раствора сравнения (не более 0,3%).

**Потеря в массе при высушивании.** Не более 0,5 %. Около 0,5 – 1,0 г (точная навеска) субстанции сушат при (103 ± 2) °C до постоянной массы (ОФС «Потеря в массе при высушивании», способ 1).

Аммоний. Не более 0,02 %.

*Испытуемый раствор.* 0,10 г тщательно растертой субстанции помещают в колбу с притертой пробкой вместимостью 25 мл и суспендируют в 1 мл воды.

К испытуемому раствору добавляют 0,3 г магния оксида, помещают в колбу под пробку полоску серебряно-марганцевой бумаги, смоченную не­сколькими каплями воды, таким образом, чтобы отрезок бумаги размером 5 x 5 мм не касался нижнего края пробки, после чего колбу немедлен­но закрывают пробкой. Содержимое колбы перемешивают, не допуская попадания брызг на бумагу, и выдерживают на водяной бане при (40 ± 2) °C в течение 30 мин.

*Стандартный раствор 100 мкг/мл аммоний-иона.* Навеску аммония хло­рида, соответствующую 74,1 мг аммония хлорида, помещают в мерную колбу вместимо­стью 100 мл, растворяют в воде и доводят объем раствора до метки тем же растворителем. Непосредственно перед использованием 10,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят объем раствора водой до метки.

*Эталонный раствор.* Готовят параллельно и в тех же условиях, что и испытуемый раствор. К 0,2 мл стандартного раствора 100 мкг/мламмоний-иона добавляют 1,0 мл воды; 0,3 г магния оксида и далее поступают, как с испытуемым раствором.

*Проведение анализа*

Серая окраска серебряно-марганцевой бумаги, полученная в опыте с испытуемым раствором, должна быть не интенсивнее окраски серебряно- марганцевой бумаги, полученной в опыте с эталонным раствором.

Железо. Не более 0,001 % (ОФС «Железо», метод 2).

*Испытуемый раствор.* 1,0 г субстанции помещают в делительную во­ронку, растворяют в 10 мл хлористоводородной кислоты разведенной 7,3 %, встряхивают с тремя порциями метилизобутилкетона очищенного (по 10 мл каждая порция) в течение 3 мин. Объединяют органические экстракты, добавляют 10 мл воды и встряхивают дополнительно в течение 3 мин. Используют водный слой.

Сульфаты. Не более 0,03 % (ОФС «Сульфаты», метод 2).

*Испытуемый раствор.* 0,5 г субстанции растворяют в 3 мл хлористо­водородной кислоты разведенной 7,3 % и доводят до 15 мл водой.

Хлориды. Не более 0,02 % (ОФС «Хлориды»).

*Испытуемый раствор.* 2,5 г субстанции помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл. Растворяют в воде, свободной от углерода диоксида, и доводят объем раствора водой до метки.

Сульфатная зола. Не более 0,1 % (в пересчете на сухое вещество)из 1,0 г (точная навеска) субстан­ции (ОФС «Сульфатная зола»).

Тяжелые металлы. Не более 0,001 %.

*Испытуемый раствор.* В кварцевый тигель, содержащий 4 мл магния сульфата раствора 25 % в серной кислоте разведенной 9,8 %, помещают 2,0 г субстанции, перемешивают тонкой стеклянной палочкой и осторожно выпа­ривают на водяной бане до сухого остатка, после чего постепенно нагревают до обугливания. Сжигание проводят при (750 ± 5) °C в течение 1 ч. Затем охлаждают и смачивают остаток в тигле несколькими каплями серной кисло­ты разведенной 9,8 %. Вновь выпаривают до сухого остатка, сжигают при (750 ± 5) °C в течение 1 ч и охлаждают. Оста­ток из тигля количественно переносят двумя порциями по 5 мл хлористоводородной кислоты разведенной 7,3 % в мерную колбу вместимостью 20 мл и добавляют 0,1 мл фенолфталеина рас­твора 0,1 %, затем нейтрализуют аммиака раствором концентрированным 25 % до перехода окраски в розовую. Полученный раствор охлаждают, добавляют уксусную кис­лоту ледяную до обесцвечивания раствора, после чего добавляют дополнительно 0,5 мл уксусной кислоты ледяной. При необходимости фильтруют и промывают фильтр. До­водят объем раствора в мерной колбе водой до 20 мл.

*Стандартный раствор 10 мкг/мл свинец-иона.* Навеску свинца (II) нит­рата, соответствующую 400 мг, помещают в мерную колбу вместимостью 250 мл, растворяют в воде и доводят водой до метки (0,1 % стандартный раствор свинец-иона). Непосредственно перед использованием 1,0 мл 0,1 % стандартного раствора свинец-иона помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл и доводят объем раствора водой до метки (стандартный раствор 100 мкг/мл свинец-иона). Непосредственно перед использованием 1,0 мл стандартного раствора 100 мкг/мл свинец-иона помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл и доводят объем раствора водой до метки.

*Стандартный раствор.* Готовят параллельно с тем же количеством реактивов и в тех же условиях, что и испытуемый раствор, используя вместо испытуемой субстан­ции 2,0 мл стандартного раствора 10 мкг/мл свинец-иона. К 10 мл полученного раствора добавляют 2,0 мл испытуемого раствора.

*Раствор сравнения.* Готовят параллельно с тем же количеством ре­активов и в тех же условиях, что и испытуемый раствор, добавляя к испытуемой суб­станции 2,0 мл стандартного раствора 10 мкг/мл свинец-иона. К 10 мл полу­ченного раствора добавляют 2,0 мл испытуемого раствора.

*Контрольный раствор.* Смешивают 10 мл воды и 2,0 мл испытуемого рас­твора.

*Проведение анализа*

К 12 мл каждого из растворов добавляют по 2 мл ацетатного буферного раство­ра pH 3,5 ± 0,1; перемешивают и добавляют по 1,2 мл тиоацетамида реактива, немедленно пе­ремешивают. Через 2 мин сравнивают окраску полученных растворов.

*Пригодность системы*

Испытание признается не действительным, ес­ли:

* стандартный раствор не окрашивается в светло-коричневый цвет в сравнении с контрольным раствором;
* окраска раствора сравнения по интенсивности меньше окраски стандартного раствора.

Субстанция соответствует требованиям испытания, если коричневая окраска испытуемого раствора по интенсивности не превышает окраску стандартного раствора.

**Аномальная токсичность.** Субстанция\* должна быть нетоксичной (ОФС «Аномальная токсичность»).

*Испытуемый раствор.* К 250 мг субстанции добавляют около 5 мл натрия хлорида раствора для инъекций 0,9 %. Полученный раствор нагревают до (40 ± 2) °C и перемешивают до полного растворения субстанции. До­водят полученный объем раствора субстанции до 5 мл. Указанный раствор используют в течение не более 6 ч после приготовления.

*Тест-доза.* 0,5 мл испытуемого раствора субстанции, содержащего 25 мг L-метионина, на мышь, внутривенно со скоростью 0,1 мл/с. Срок наблюдения 48 ч.

\**Примечание.* Для субстанции, предназначенной для производства стерильных лекарственных форм.

**Бактериальные эндотоксины.\*** Не более 20,0 ЕЭ/г. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Бактериальные эндотоксины».

\**Примечание.* Для субстанции, предназначенной для производства стерильных лекарственных форм.

**Микробиологическая чистота.** Испытание проводят в соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота».

**Количественное определение.** Определение проводят методом титриметрии в соответствии с ОФС «Кислотно-основное титрование в неводных средах».

Около 125 мг (точная навеска) субстанции растворяют в 5 мл муравьи­ной кислоты безводной и добавляют 30 мл уксусной кислоты ледяной. Титруют 0,1 М раствором хлорной кислоты, определяя конечную точку тит­рования потенциометрически (ОФС «Потенциометрическое титрование»).

Параллельно проводят контрольный опыт в аналогичных условиях.

1,0 мл 0,1 М раствора хлорной кислоты соответствует 14,92 мг L-метионина (C5H11NO2S).

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