МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСУДАРСТВЕННАЯ
ФАРМАКОПЕЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

XIV издание

Том I

Москва
2018

Научные редакторы

Емшанова Светлана Витальевна, профессор, доктор фармацевтических наук, начальник отдела научных разработок ЦКП (НОЦ) РУДН

Потанина Ольга Георгиевна, доктор фармацевтических наук, директор Центра научных исследований и разработок ЦКП (НОЦ) РУДН

Буданова Елена Вячеславовна, кандидат медицинских наук, доцент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГАОУ ВО Первого МГМУ им. И.М. Сеченова

Чистяков Виктор Владимирович, доктор фармацевтических наук, профессор, директор центра доклинических и клинических исследований ЦКП (НОЦ) РУДН

Технический редактор

Горюн Маргарита Ивановна, заведующая редакцией Химико-фармацевтического журнала

Предисловие

Четырнадцатому изданию Государственной фармакопеи Российской Федерации предшествовали следующие официальные издания Фармакопеи на русском языке: первое – 1866 г., второе – 1871 г., третье – 1880 г., четвертое – 1891 г., пятое – 1902 г., шестое – 1910 г., седьмое – 1925 г., восьмое – 1946 г., девятое – 1961 г., десятое – 1968 г., одиннадцатое – 1987 г. (первый выпуск) и 1990 г. (второй выпуск), двенадцатое – 2007 г. (часть 1), тринадцатое – 2015 г.

В подготовке общих фармакопейных статей и фармакопейных статей Государственной фармакопеи Российской Федерации XIV издания и их рецензировании активное участие принимали специалисты Федерального государственного бюджетного учреждения «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России), Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет), Федерального государственного автономного образовательного учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов» (ФГАОУ ВО РУДН), Государственного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений» Российской академии сельскохозяйственных наук (ГНУ ВИЛАР Россельхозакадемии), Федерального государственного бюджетного образовательного учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России), Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала федерального государственного бюджетного образовательного учреждения

высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ПМФИ - филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России), Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России), Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (НИУ «БелГУ»), Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России), Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения российской Федерации (ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России), ОАО «Центр по химии лекарственных средств - Всероссийский научно-исследовательский химико-фармацевтический институт» (ОАО «ЦХЛС-ВНИХФИ»), ОАО «Всероссийский научный центр по безопасности биологически активных веществ» (ОАО «ВНЦ БАВ») и других ведущих научных центров и ассоциаций отечественных и зарубежных производителей лекарственных средств.

Введение

Государственная фармакопея Российской Федерации XIV издания (ГФ РФ XIV издания) состоит из вводной части, основной части и приложений. Основная часть содержит 319 общих фармакопейных статей (ОФС) и 661 фармакопейную статью (ФС), представленных в соответствующих разделах.

Раздел «Общие фармакопейные статьи» содержит подраздел **«Общие положения»,** в который включены 25 общих фармакопейных статей, из которых 5 ОФС включены впервые, такие как «Стабильность биологических лекарственных препаратов», «Валидация микробиологических методик», «Родственные примеси в фармацевтических субстанциях и лекарственных препаратах», «Уменьшение риска передачи возбудителей губчатой энцефалопатии животных при применении лекарственных препаратов», «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств», 6 ОФС, такие как «Правила пользования фармакопейными статьями», «Стандартные образцы», «Стабильность и сроки годности лекарственных средств», «Хранение лекарственных средств», «Стерилизация» и «Мерная посуда» переработаны, дополнены и введены взамен, включенных ранее в ГФ X, XI, XII изданий.

В раздел «Общие фармакопейные статьи также входят следующие подразделы: «Методы анализа лекарственных средств», «Реактивы», «Лекарственные формы и методы их анализа», «Лекарственное растительное сырье и методы оценки его качества», «Гомеопатическое сырье растительного, животного и минерального происхождения», «Лекарственные формы, применяемые в гомеопатической практике», «Биологических лекарственных препаратов и методы их анализа, в том числе лекарственные препараты, полученные из крови и плазмы крови человека и животных», «Радиофармацевтические лекарственные средства».

В подразделе «**Методы анализа лекарственных средств»** изложены общие методы анализа, реактивы и индикаторы, титрованные и буферные растворы.

Подраздел **«Лекарственное растительное сырье и методы оценки его качества»** содержит ОФС на морфологические группы лекарственного растительного сырья, отдельные группы лекарственных средств растительного происхождения.

Подраздел **«Биологические лекарственные препараты»** включает в себя ОФС на группы биологических лекарственных препаратов, в том числе группы лекарственных препаратов, полученных из крови и плазмы крови человека и животных, а также методы, используемые в их стандартизации и последующей оценке качества.

В подразделе **«Лекарственные формы и методы их анализа»** представлены ОФС, регламентирующие требования к лекарственным формам и методам их анализа, включая ОФС по определению фармацевтико-технологических показателей.

Впервые в ГФ РФ XIV издания включен подраздел **«Гомеопатические лекарственные средства»,** состоящий из следующих подразделов: «Лекарственное растительное сырье для гомеопатических лекарственных препаратов», «Лекарственные формы гомеопатических препаратов», «Гомеопатические фармацевтические субстанции», в состав которых входят ОФС и ФС на гомеопатические лекарственные средства, регламентирующих требования, предъявляемые к сырью растительного, животного и минерального происхождения, используемому для получения гомеопатических лекарственных средств, к лекарственным формам, в виде которых применяются гомеопатические лекарственные препараты, а также к гомеопатическим фармацевтическим субстанциям.

Фармакопейные статьи представлены в разделах «Фармацевтические субстанции» и «Лекарственные препараты».

Раздел «Фармацевтические субстанции» содержит фармакопейные статьи на фармацевтические субстанции синтетического, минерального, растительного происхождения, в том числе, предназначенных к применению

в производстве/изготовлении гомеопатических лекарственных средств и используемых в качестве действующих и/или вспомогательных веществ.

Раздел «Лекарственные препараты» состоит из следующих подразделов: лекарственные препараты на основе фармацевтических субстанций синтетического происхождения, лекарственные препараты на основе фармацевтических субстанций минерального происхождения, лекарственные препараты растительного происхождения, биологические лекарственные препараты, включая лекарственные препараты, полученные из крови и плазмы крови человека.

В приложениях к ГФ РФ XIV издания приведены справочные таблицы: таблица атомных масс, алкоголеметрические таблицы, таблица изотонических эквивалентов лекарственных веществ по натрия хлориду, таблица количества капель в 1 г и в 1 мл и масса 1 капли жидких лекарственных препаратов при температуре 20 °С по стандартному каплемеру, рисунки ИК-спектров стандартных образцов фармацевтических субстанций, фармакопейные статьи на которые включены в текущее издание.

Впервые в ГФ РФ XIV издания вводится 72 общих фармакопейных статьи, среди которых 5 ОФС, регламентирующие общие положения, 16 ОФС на методы анализа, 18 ОФС на лекарственные формы и 1 ОФС на методы определения фармацевтико-технологических показателей лекарственных форм, 1 ОФС на метод анализа лекарственного растительного сырья и фармацевтических субстанций растительного происхождения, 21 ОФС на группы биологических лекарственных средств и методы их анализа, включая лекарственные препараты, полученные из крови и плазмы крови человека, 1 ОФС на генотерапевтические лекарственные препараты, 3 ОФС на лекарственное сырьё различного происхождения, используемое в гомеопатической практике и 6 ОФС на лекарственные формы, в которых применяются гомеопатические лекарственные препараты.

В ГФ РФ XIV издания впервые вводятся 164 фармакопейных статей, среди которых 40 ФС на фармацевтические субстанции синтетического и

минерального происхождения и 75 ФС на лекарственные препараты на основе этих субстанций, 8 ФС на биологические лекарственные препараты различного происхождения, в том числе получаемые из крови и плазмы крови человека, 41 ФС на гомеопатические фармацевтические субстанции растительного и минерального происхождения.

В заголовках фармакопейных статей на фармацевтические субстанции принята следующая последовательность названий: международное непатентованное наименование (МНН) или модифицированное международное непатентованное наименование (ММНН), установленное ВОЗ, на русском языке, тривиальное название, название на латинском языке, а на лекарственное растительное сырье, фармацевтические субстанции растительного происхождения, лекарственные растительные препараты, биологические лекарственные препараты – группировочное название на русском и латинском языках. Наименования гомеопатических фармацевтических субстанций приведены на русском и латинском языках, при этом название на русском языке представляет собой транслитерацию названия на латинском языке, а не перевод.

Часть действующих в настоящее время ОФС и ФС ГФ СССР X издания, ГФ СССР XI издания, ГФ РФ XII издания (часть 1), ГФ РФ XIII издания пересмотрены и дополнены материалами с учетом современных требований, научных и практических достижений в области фармакопейного анализа и включены в ГФ РФ XIV издания.

Ряд ОФС и ФС, ранее представленных в Государственной фармакопее СССР X и XI изданий, ГФ РФ XII издания (часть 1), исключен из практики современного фармакопейного анализа.

ОФС «Правила пользования фармакопейными статьями» дополнена новыми разделами и подразделами, характеризующими основные термины, понятия и конкретные методики, включаемые как в общие фармакопейные статьи, так и в фармакопейные статьи. По сравнению с ГФ РФ XIII издания статья существенно переработана в сторону конкретизации.

ОФС «Реактивы. Индикаторы». По сравнению с ГФ РФ XIII издания количество приведённых реактивов увеличено примерно на 15 %. Включены реактивы, предусмотренные в фармакопейных статьях, вводимых в ГФ РФ впервые.

ОФС «Общие реакции на подлинность». Дополнительно включены подразделы: лактаты (одна качественная реакция), серебро (две качественные реакции) и силикаты (одна качественная реакция).

ОФС «Буферные растворы». По сравнению с ГФ РФ XIII издания количество приведённых буферных растворов увеличено примерно на 10 %. Включены буферные растворы, предусмотренные в фармакопейных статьях, вводимых в фармакопею впервые.

ОФС «Титрованные растворы». По сравнению с ГФ РФ XIII издания количество приведённых титрованных растворов увеличено примерно на 10 %. Включены титрованные растворы, предусмотренные в фармакопейных статьях, вводимых в фармакопею впервые.

ОФС «Потеря в массе при высушивании». Добавлен способ 3, предусматривающий высушивание в вакуумном сушильном шкафу.

ОФС «Родственные примеси в фармацевтических субстанциях и лекарственных препаратах» вводится впервые. Содержит требования к контролю родственных примесей в лекарственных средствах, преимущественно синтетического и минерального происхождения.

ОФС «Стабильность биологических лекарственных средств» содержит материалы по изучению стабильности и, как следствие, определению сроков годности биологических лекарственных средств различного происхождения, позволяющие устанавливать требования к методам и методикам, используемым в ходе проводимых испытаний.

В **ОФС «Валидация микробиологических методик»** впервые в практике отечественного фармакопейного анализа дана характеристика процесса валидации микробиологических методик и определены основные его параметры.

ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств» содержит перечень возможных видов упаковки лекарственных средств, требования к качеству упаковки, маркировке лекарственных средств, условиям их транспортирования, соблюдение которых позволяет обеспечить и гарантировать должное качество лекарственных средств.

ОФС «Уменьшение риска передачи возбудителей губчатой энцефалопатии животных при применении лекарственных средств» регламентирует требования, предъявляемые к исходному сырью животного происхождения, промежуточным продуктам и получаемым из него лекарственным средствам, соблюдение которых позволяет уменьшить риск и избежать опасности попадания в них возбудителей губчатой энцефалопатии и последующего заражения ею потребителей лекарственных средств.

Впервые в ГФ РФ XIV издания вводятся такие методы физико-химического анализа как: **«Аминокислотный анализ», «Спектроскопия кругового дихроизма», «Термический анализ», «Эксклюзионная хроматография», «Афинная хроматография», «Определение содержания общего органического углерода в воде для фармацевтического применения», «Молекулярно-массовое распределение декстранов»,** ОФС на которые регламентируют область применения и условия выполнения этих исследований.

Методы анализа, включенные в Государственную Фармакопею РФ, пополнились методами количественного определения. В числе ОФС, впервые включаемых в этот раздел, следует отметить **«Определение свинца в глюкозе», «Определение метанола и 2-пропанола», «Определение N,N-диметиланилина», «Определение 2-этилгексановой кислоты», «Никель в полиолах».** Перечисленные ОФС содержат методики, позволяющие устанавливать количественное содержание различных примесей, как в фармацевтических субстанциях, так и в лекарственных препаратах. Следует при этом отметить, что содержание метанола и 2-пропанола определяется в

настойках, в том числе гомеопатических матричных, а также в спиртовых экстрактах, как правило, на стадии производственного процесса, возлагая на производителя ответственность за предотвращение попадания этих токсических примесей в лекарственное средство.

Раздел «Методы биологического анализа» состоит из 17 ОФС. В ГФ XIV издания впервые введены 4 ОФС: «Биологические испытания гонадотропинов», «Вирусная безопасность», «Тест на активацию моноцитов», «Определение специфической активности препаратов эритропоэтина», 10 ОФС остались в прежней редакции ГФ РФ XIII издания.

ОФС «Определение антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар» была актуализирована, в неё введены условия проведения испытания методом диффузии в агар для ванкомицина, полимиксина В и ряда других, приведены условия получения достоверных результатов с использованием трехдозного варианта метода диффузии в агар, предусмотрено проведение испытания с использованием квадратных чашек Петри размером 20×245×245 мм с использованием схемы латинского квадрата.

С целью гармонизации с требованиями, принятыми действующими зарубежными фармакопеями, в **ОФС «Микробиологическая чистота»** уточнены допустимые пределы содержания микроорганизмов в различных лекарственных средствах, включая биологические лекарственные препараты, и воду для инъекций (антро). Актуализирован и дополнен перечень видов и тест-штаммов микроорганизмов.

В **ОФС «Испытание на депрессорные вещества»** для гармонизации условий проведения методик испытания на депрессорные вещества, включенных в ГФ РФ XIV издания с зарубежными фармакопеями, введен ещё один вариант проведения исследований (1), вариант 2 оставлен без изменений и соответствует ОФС ГФ РФ XIII издания.

ОФС «Вирусная безопасность» характеризует требования к испытаниям, позволяющим оценить чистоту исходного сырья,

фармацевтических субстанций и препаратов от присутствия вирусов и продуктов их жизнедеятельности. Имеет особое значение при оценке качества биологических лекарственных средств.

К методам биологического анализа следует отнести **«Тест на активацию моноцитов»** и **«Определение специфической активности препаратов эритропоэтина»**. ОФС, регламентирующие область применения и условия проведения этих испытаний позволяют ввести в отечественную практику фармакопейного анализа данные методы биологического анализа.

Обращение на фармацевтическом рынке Российской Федерации лекарственных препаратов в различных лекарственных формах, число которых достигает 40 наименований, привело к необходимости введения в фармакопейную практику таких ОФС как: **«Газы медицинские», «Губки лекарственные», «Импланты», «Капли», «Карандаши лекарственные», «Концентраты», «Леденцы», «Лиофилизаты», «Пастилки», «Пены», «Плёнки», «Плитки», «Резинки жевательные лекарственные», «Системы терапевтические», «Соки», «Тампоны лекарственные», «Шампуни лекарственные, «Эликсиры».**

В перечисленных ОФС впервые регламентированы требования к отдельным лекарственным формам, часть из которых характерна для лекарственных препаратов только российских производителей (например, карандаши лекарственные), а часть внедрена в зарубежные и отечественные фармацевтические производства сравнительно недавно и не относится к числу традиционных. Это системы терапевтические, резинки жевательные лекарственные, тампоны лекарственные, шампуни лекарственные и некоторые другие.

ОФС «Растворение для резинок жевательных лекарственных» регламентирует требования, предъявляемые к проведению фармацевтико-технологического испытания на растворение лекарственных препаратов, представленных в такой лекарственной форме как резинки жевательные. В статье дана характеристика оборудования и условий проведения испытания,

а также приведены критерии оценки качества лекарственных препаратов в этой лекарственной форме по показателю «Растворение».

Впервые в ГФ РФ XIV издания включен подраздел «Гомеопатические лекарственные средства», содержащий 20 ОФС, регламентирующих требования, предъявляемые к лекарственному сырью и лекарственным формам для гомеопатических лекарственных препаратов, из которых 9 вводятся впервые.

ОФС «Лекарственное растительное сырье для гомеопатических лекарственных препаратов», «Сырье животного происхождения для гомеопатических лекарственных препаратов» и «Сырье минерального и химического происхождения для гомеопатических лекарственных препаратов», используемого в производстве/изготовлении гомеопатических лекарственных средств, содержат общие сведения об источниках получения сырья, особенностях технологии, методах испытаний и особенностях хранения.

Впервые предложены к введению в практику отечественного фармакопейного анализа **ОФС «Лекарственные формы для гомеопатических лекарственных препаратов»**, которая содержит основные термины и определения («гомеопатическая фармацевтическая субстанция», «гомеопатическое лекарственное средство», «гомеопатический лекарственный препарат»), а также классификацию и перечень лекарственных форм.

Подраздел содержит 16 ОФС на отдельные лекарственные формы, используемые для гомеопатических лекарственных препаратов, 5 из которых введены впервые. Каждая статья включает описание специфической технологии для гомеопатической лекарственной формы, используемые вспомогательные вещества и испытания. В номенклатуре гомеопатических лекарственных форм имеются лекарственные формы, к которым относятся: гранулы гомеопатические, оподельдоки гомеопатические, разведения гомеопатические и смеси гомеопатические, тритурации гомеопатические и

некоторые другие, характерные к применению только в гомеопатической практике.

ОФС «Определение содержания сока в свежем лекарственном растительном сырье» вводится впервые в ГФ РФ. Определение содержания сока в лекарственном растительном сырье (ЛРС) является необходимым условием при разработке как нормативных показателей для ЛРС, используемого для получения препаратов на основе соков растений и гомеопатических лекарственных средств (настоек гомеопатических матричных), так и технологических регламентов на получение препаратов из свежего ЛРС. Проект ОФС содержит 4 способа определения содержания сока. Способы 1 и 2 предназначены для определения содержания «выжатого сока» для сырья, используемого для производства/изготовления аллопатических препаратов.

Способы 3 и 4 предназначены для определения содержания сока в лекарственном растительном сырье, используемом для производства/изготовления гомеопатических лекарственных препаратов.

Раздел «Биологические лекарственные препараты и методы их анализа».

Иммунобиологические и биотехнологические лекарственные препараты.

В подраздел входят 17 наименований ОФС, 8 из которых введены в ГФ РФ XIV издания впервые: **«Интерфероны»**, **«ДНК-вакцины»**, **«Моноклональные антитела для медицинского применения»**, **«Филграстимы»**, **«Эритропоэтины»**, **«Генно-инженерные препараты инсулина человека»**. **ОФС «Биологические лекарственные препараты»** и **«Биотехнологические лекарственные препараты»** разработаны и введены в ГФ РФ XIV издания в связи с изменениями в 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» (изменения к ФЗ от 22.12.2014 № 429), а **ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты»** гармонизирована в связи с этими изменениями.

В подраздел **«Методы биологических лекарственных препаратов»** включены 40 ОФС: 31 ОФС остались без изменений; в 3 ОФС внесены дополнительные методы анализа по количественному определение фенола (метод обращено-фазовой ВЭЖХ), формальдегида (метод с ацетилацетоновым реагентом) и тиомерсала (метод атомно-абсорбционной спектроскопии холодного пара).

Впервые включены в ГФ РФ XIV издания 6 ОФС: **«Пептидное картирование», «Спектроскопия ядерного магнитного резонанса для индентификации пептидов», «Определение маннита (маннитола) в биологических лекарственных препаратах», «Определение содержания тритона Х-100 методом обращено-фазовой ВЭЖХ», «Метод электрофореза ДНК в агаровом геле», «Оценка специфической (аллергенной) активности аллергенов и аллергоидов методом кожных проб».**

В подраздел **«Лекарственные препараты из крови и плазмы крови человека и животных и методы их анализа»** включены 6 ОФС, 3 ОФС остались без изменений, а 3 ОФС введены впервые: **«Кровезаменители»**, **«Факторы свертывания крови человека (генно-инженерные, рекомбинантные)»**, **«Вирусная безопасность лекарственных препаратов из плазмы крови человека»**. Все вновь введенные статьи разработаны с учетом современных международных требований.

В подраздел «**Методы анализа лекарственных препаратов из крови и плазмы крови человека и животных»** включены 13 ОФС, 8 ОФС остались без изменений, в **ОФС «Определение активности факторов свертывания крови человека»** внесены необходимые уточнения, а 4 ОФС введены впервые: **«Количественное определение белка колориметрическим методом с биуретовым реактивом в препаратах крови человека и животных»**, в которую включены 2 методики разного назначения, **«Количественное определение мальтозы методом Хагедорна-Йенсена в препаратах из плазмы крови человека»**, «**Количественное**

определение иммуноглобулинов классов G, M и A в препаратах иммуноглобулина человека», **«Определение содержания активатора прекалликреина в лекарственных препаратах из плазмы крови человека»**.

В ГФ РФ XIV издания впервые введен новый подраздел «**Генотерапевтические лекарственные препараты и методы их анализа»,** в связи с изменениями в 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» (изменения к ФЗ от 22.12.2014 № 429), в который включена новая классификационная группа биологических лекарственных препаратов - генотерапевтические лекарственные препараты. В связи с этим, была разработана и впервые введена в ГФ РФ XIV издания **ОФС «Генотерапевтические лекарственные препараты»**.

Перечень общих фармакопейных статей, впервые вводимых в действие

Общие положения

1. Стабильность биологических лекарственных средств
2. Валидация микробиологических методик
3. Родственные примеси в фармацевтических субстанциях и лекарственных препаратах
4. Уменьшение риска передачи возбудителей губчатой энцефалопатии животных при применении лекарственных средств
5. Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств

Методы анализа лекарственных средств

Методы физического и физико-химического анализа

6. Аминокислотный анализ
7. Определение содержания общего органического углерода в воде для фармацевтического применения
8. Термический анализ
9. Молекулярно-массовое распределение декстранов
10. Спектроскопия кругового дихроизма
11. Эксклюзионная хроматография
12. Афинная хроматография

Методы количественного определения

13. Определение свинца в глюкозе
14. Определение метанола и 2-пропанола
15. Определение N,N-диметиланилина
16. Определение 2-этилгексановой кислоты
17. Никель в полиолах

Методы биологического анализа

18. Биологические испытания гонадотропинов
19. Вирусная безопасность
20. Тест на активацию моноцитов
21. Определение специфической активности препаратов эритропоэтина

Лекарственные формы лекарственных средств и методы их анализа

Лекарственные формы лекарственных средств

22. Газы медицинские
23. Губки лекарственные
24. Импланты
25. Капли
26. Карандаши лекарственные
27. Концентраты
28. Леденцы
29. Лиофилизаты
30. Пастилки
31. Пены
32. Пленки
33. Плитки
34. Резинки жевательные лекарственные
35. Системы терапевтические
36. Соки
37. Тампоны лекарственные
38. Шампуни лекарственные
39. Эликсиры

Фармацевтико-технологические испытания на лекарственные формы

40. Растворение для резинок жевательных лекарственных

Методы анализа лекарственного растительного сырья

41. Определение содержания сока в свежем лекарственном растительном сырье

Гомеопатические лекарственные средства

Лекарственное сырье для гомеопатических лекарственных препаратов

42. Лекарственное растительное сырье для гомеопатических лекарственных препаратов

43. Сырье животного происхождения для гомеопатических лекарственных препаратов

44. Сырье минерального и химического происхождения для гомеопатических лекарственных препаратов

Лекарственные формы гомеопатических препаратов

45. Лекарственные формы для гомеопатических лекарственных препаратов

46. Гранулы (пилюли) импрегнированные гомеопатические

47. Капли гомеопатические

48. Пластыри гомеопатические

49. Спреи гомеопатические

50. Таблетки гомеопатические

Биологические лекарственные препараты и методы их анализа

Иммунобиологические и биотехнологические лекарственные препараты

51. Биологические лекарственные препараты

52. Биотехнологические лекарственные препараты

53. Интерфероны

54. ДНК вакцины

55. Моноклональные антитела для медицинского применения

56. Филграстимы

57. Эритропоэтины

58. Генно-инженерные препараты инсулина человека

Методы анализа биологических лекарственных препаратов

59. Пептидное картирование

60. Спектроскопия ядерного магнитного резонанса для идентификации пептидов

61. Определение маннита (маннитола) в биологических лекарственных препаратах

62. Определение содержания тритона Х-100 методом обращено-фазовой ВЭЖХ

63. Метод электрофореза ДНК в агарозном геле

64. Оценка специфической (аллергенной) активности аллергенов и аллергоидов методом кожных проб

Лекарственные препараты из крови и плазмы крови человека и животных и методы их анализа

Лекарственные препараты из крови и плазмы крови человека и животных

65. Кровезаменители

66. Факторы свертывания крови человека (генно-инженерные, рекомбинантные)

67. Вирусная безопасность лекарственных препаратов из плазмы крови человека

Методы анализа лекарственных препаратов из крови и плазмы крови человека и животных

68. Количественное определение белка колориметрическим методом с биуретовым реактивом в препаратах крови человека и животных

69. Количественное определение мальтозы методом Хагедорна-Йенсена в препаратах из плазмы крови человека

70. Количественное определение иммуноглобулинов классов G, M и A в препаратах иммуноглобулина человека

71. Определение содержания активатора прекалликреина в лекарственных препаратах из плазмы крови человека

Генотерапевтические лекарственные препараты и методы их анализа

72. Генотерапевтические лекарственные препараты

Перечень фармакопейных статей, впервые вводимых в действие

Фармацевтические субстанции синтетического происхождения

1. Амброксола гидрохлорид
2. Амоксициллин натрия
3. Амоксициллина тригидрат
4. Аторвастатин кальция тригидрата
5. Бетагистина дигидрохлорид
6. Бетаметазон
7. Бетаметазона дипропионат
8. Бетаметазона натрия фосфат
9. Бисопролола фумарат
10. Винпоцетин
11. Гемцитабина гидрохлорид
12. Гипромеллоза
13. Дексаметазона натрия фосфат
14. Кетопрофен
15. Кларитромицин
16. Клопидогрела сульфат
17. Ксилометазолина гидрохлорид
18. Левофлоксацин
19. Лозартан калия
20. Лоратадин
21. Макрогол 3350
22. Метопролола сукцинат
23. Метопролола тартрат
24. Нимесулид
25. Омепразол
26. Офлоксацин
27. Периндоприл-эрбумин
28. Преднизолон натрия фосфат

29. Пропиленгликоль
30. Рисперидон
31. Тиамина нитрат
32. Тимолола малеат
33. Флуконазол
34. Хлорамфеникола натрия сукцинат
35. Цефотаксим натрия
36. Ципрофлоксацин
37. Ципрофлоксацина гидрохлорид

Фармацевтические субстанции минерального происхождения

38. Вода для гемодиализа
39. Кислород газ медицинский
40. Кислород медицинский жидкий

Гомеопатические фармацевтические субстанции

41. Азарум эуропеум–Asarum europaeum
    Настойка гомеопатическая матричная
42. Аконитум зоонгарикум (4) – Aconitum soongaricum (4)
    Настойка гомеопатическая матричная
43. Анемоне немороза – Anemone nemorosa
    Настойка гомеопатическая матричная
44. Артемизия абротанум (Абротанум) – Artemisia abrotanum (Abrotanum)
    Настойка гомеопатическая матричная
45. Артемизия абсинтиум (Абсинтиум) – Artemisia absinthium (Absinthium)
    Настойка гомеопатическая матричная
46. Артемизия вульгарис – Artemisia vulgaris
    Настойка гомеопатическая матричная
47. Атропа белла-донна (Белладонна) (4) – Atropa bella-donna (Belladonna) (4)
    Настойка гомеопатическая матричная

48. Берберис вульгарис е фруктибус (Берберис, фруктус) – Berberis vulgaris e fructibus (Berberis, Fructus)

Настойка гомеопатическая матричная

49. Берберис вульгарис (Берберис) – Berberis vulgaris (Berberis)

Настойка гомеопатическая матричная

50. Ваччиниум миртиллус (Миртиллус) –Vaccinium myrtillus (Myrtillus)

Настойка гомеопатическая матричная

51. Вербаскум денсифлорум (Вербаскум) (4) –Verbascum densiflorum (Verbascum) (4)

Настойка гомеопатическая матричная

52. Гиосциамус нигер – Hyoscyamus niger

Настойка гомеопатическая матричная

53. Гиперикум перфоратум (Гиперикум) (4) – Hypericum perforatum (Hypericum) (4)

Настойка гомеопатическая матричная

54. Гиперикум перфоратум (Гиперикум) – Hypericum perforatum (Hypericum)

Настойка гомеопатическая матричная

55. Датура страмониум (Страмониум) – Datura stramonium (Stramonium)

Настойка гомеопатическая матричная

56. Кактус грандифлорус (Кактус) – Cactus grandiflorus (Cactus)

Настойка гомеопатическая матричная

57. Календула оффициналис флорес (4) – Calendula officinalis flores (4)

Настойка гомеопатическая матричная

58. Календула оффициналис херба (Календула) – Calendula officinalis herba (Calendula)

Настойка гомеопатическая матричная

59. Калиум броматум – Kalium bromatum

60. Калиум иодатум (Калиум йодатум) – Kalium iodatum (Kalium jodatum)

61. Калиум хлоратум – Kalium chloratum

62. Кверкус (4) – Querqus (4)

Настойка гомеопатическая матричная

63. Коффея арабика (Коффея) (4) – Coffea Arabica (Coffea) (4)

Настойка гомеопатическая матричная

64. Коффея тоста (4) – Coffea tosta (4)

Настойка гомеопатическая матричная

65. Колхикум аутумнале (Колхикум) – Colchicum autumnale (Colchicum)

Настойка гомеопатическая матричная

66. Натриум сульфурикум – Natrium sulfuricum

67. Натриум тетраборацикум (Боракс) – Natrium tetraboracicum (Borax)

68. Натриум хлоратум – Natrium chloratum

69. Никотиана табакум (Табакум) (4) – Nicotiana tabacum (Tabacum) (4)

Настойка гомеопатическая матричная

70. Парнасия палюстрис (Парнасия) – Parnassia palustris (Parnassia)

Настойка гомеопатическая матричная

71. Пеония оффициналис (Пеония) (4) – Paeonia officinalis (Paeonia) (4)

Настойка гомеопатическая матричная

72. Пульсатилла пратенсис – Pulsatilla pratensis

Настойка гомеопатическая матричная

73. Рододендрон ауреум (Рододендрон) –Rhododendron aureum (Rhododendron)

Настойка гомеопатическая матричная

74. Рута гравеоленс (Рута) – Ruta graveolens (Ruta)

Настойка гомеопатическая матричная

75. Токсикодендрон кверцифолиум (Рус токсикодендрон) – Toxicodendron quercifolium (Rhus toxicodendron)

Настойка гомеопатическая матричная

76. Фукус везикулозус (Фукус) – Fucus vesiculosus (Fucus)

Настойка гомеопатическая матричная

77. Хелидониум майус (Хелидониум) – Chelidonium majus (Chelidonium)

Настойка гомеопатическая матричная

78. Цимицифуга рацемоза (Цимицифуга) – Cimicifuga racemosa (Cimicifuga)

Настойка гомеопатическая матричная

79. Эхинацея пурпуреа (4) – Echinacea purpurea (4)

Настойка гомеопатическая матричная

80. Югланс регия (Югланс) (4а) – Juglans regia (Juglans) (4a)

Настойка гомеопатическая матричная

81. Югланс регия (Югланс) – Juglans regia (Juglans)

Настойка гомеопатическая матричная

Лекарственные препараты на основе субстанций синтетического происхождения

82. Амлодипина безилат, таблетки

83. Амоксициллин, капсулы

84. Амоксициллин, порошок для приготовления суспензии для приема внутрь

85. Амоксициллин, таблетки

86. Ампициллин натрия, порошок для приготовления раствора для внутривенного т внутримышечного введения

87. Аторвастин кальция, таблетки

88. Вальпроат натрия, гранулы с пролонгированным высвобождением

89. Вальпроат натрия, капли для приёма внутрь

90. Вальпроат натрия, сироп

91. Вальпроат натрия, таблетки

92. Вальпроевая кислота, капсулы

93. Винпоцетин, раствор для инъекций, концентрат для приготовления раствора для инфузий

94. Винпоцетин, таблетки

95. Гликлазид, таблетки

96. Дексаметазон, имплантат для интравитреального введения

97. Дексаметазон, капли глазные

98. Дексаметазон, таблетки

99. Дексаметазона натрия фосфат, капли глазные

100. Дексаметазона натрия фосфат, раствор для инъекций

101. Ибупрофен, гель для наружного применения

102. Ибупрофен, капсулы

103. Ибупрофен, крем для наружного применения

104. Ибупрофен, раствор для инъекций

105. Ибупрофен, суппозитории ректальные

106. Ибупрофен, суспензия для приёма внутрь

107. Ибупрофен, таблетки

108. Индапамид, капсулы

109. Индапамид, таблетки

110. Кетопрофен, аэрозоль для наружного применения

111. Кетопрофен, гель для наружного применения

112. Кетопрофен, гранулы для приготовления раствора для приёма внутрь

113. Кетопрофен, капсулы

114. Кетопрофен, крем для наружного применения

115. Кетопрофен, раствор для инъекций и инфузий

116. Кетопрофен, суппозитории ректальные

117. Кетопрофен, таблетки

118. Кеторолака трометамол, гель для наружного применения

119. Кеторолака трометамол, капли глазные

120. Кеторолака трометамол, раствор для инъекций

121. Кларитромицин, гранулы для приготовления суспензии для приёма внутрь

122. Кларитромицин, капсулы

123. Кларитромицин, лиофилизат для приготовления раствора для инфузий

124. Кларитромицин, таблетки

125. Левофлоксацин, капли глазные

126. Левофлоксацин, раствор для инфузий

127. Левофлоксацин, таблетки

128. Лизиноприл, таблетки

129. Лозартан калия, таблетки

130. Лоратадин, сироп

131. Лоратадин, суспензия для приёма внутрь

132. Мелоксикам, раствор для инъекций

133. Мелоксикам, суппозитории ректальные

134. Мелоксикам, таблетки

135. Метопролола тартрат, раствор для инъекций

136. Нимесулид, гель для наружного применения

137. Нимесулид, гранулы для приготовления суспензии для приёма внутрь

138. Нимесулид, суспензия для приёма внутрь

139. Нимесулид, таблетки

140. Нифедипин, таблетки

141. Офлоксацин, капли глазные и ушные

142. Офлоксацин, мазь глазная

143. Офлоксацин, раствор для инфузий

144. Пиразинамид, таблетки

145. Рибавирин, капсулы

146. Рибавирин, крем для местного и наружного применения

147. Рибавирин, таблетки

148. Тимолола малеат, гель глазной

149. Тимолола малеат, капли глазные

150. Эналаприла малеат, таблетки

151. Этилметилгидроксипиридина сукцинат, капсулы

Лекарственные препараты на основе субстанций минерального происхождения

152. Магния сульфат, порошок для приготовления раствора для приёма внутрь

153. Натрия гидрокарбонат, порошок для приготовления раствора для приёма внутрь и местного применения

154. Натрия гидрокарбонат, раствор для инфузий

155. Натрия хлорид, раствор для инъекций, раствор для инфузий, растворитель для приготовления лекарственных форм для инъекций

156. Натрия хлорид, спрей назальный

Иммунобиологические и биотехнологические лекарственные препараты

157. Вакцина против коклюша, дифтерии, столбняка и гепатита В адсорбированная, суспензия для внутримышечного введения

158. Вакцина комбинированная против гепатита В и анатоксина дифтерийно-столбнячного с уменьшенным содержанием антигенов адсорбированная, суспензия для внутримышечного введения

159. Вакцина гемофильная тип b конъюгированная, лиофилизат для приготовления раствора для внутримышечного введения

160. Интерферон человеческий рекомбинантный альфа-2b, субстанция раствор, раствор замороженный

161. Пробиотик бактерий сенной палочки монокомпонентный, суспензия для приёма внутрь

162. Пробиотик споровых бактерий поликомпонентный, таблетки

Лекарственные препараты, полученные из крови и плазмы человека и животных

163. Иммуноглобулин человека противостолбнячный

164. Антитромбин III человека

Состав Совета Министерства здравоохранения Российской Федерации по государственной фармакопее

Председатель:

Романов Филипп Александрович	директор Департамента государственного регулирования обращения лекарственных средств Министерства здравоохранения Российской Федерации

Заместители председателя:

Саканян Елена Ивановна	директор Центра фармакопеи и международного сотрудничества ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, д.ф.н., проф. (по согласованию)
Раменская Галина Владиславовна	директор института фармации, заведующая кафедрой фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М.Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский университет), д.ф.н., проф. (по согласованию)

Секретарь:

Шемерянкина Татьяна Борисовна	начальник отдела государственной фармакопеи и фармакопейного анализа Центра фармакопеи и международного

	сотрудничества ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, к.ф.н. (по согласованию)

Члены Совета:

Абрамович Римма Александровна	директор Центра коллективного пользования (научно-образовательный центр) ФГБОУ «Российского университета дружбы народов», д.ф.н., доцент (по согласованию)
Алешкин Геннадий Иванович	руководитель лаборатории генетики бактерий, отдела генетики и молекулярной биологии бактерий ФГБУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, д.м.н. (по согласованию)
Багирова Валерия Леонидовна	д.ф.н., проф. (по согласованию)
Боковикова Татьяна Николаевна	начальник лаборатории химико-фармацевтических препаратов № 1 Центра экспертизы и контроля готовых лекарственных средств ФГБУ «Научный

	центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, д.ф.н. (по согласованию)
Волкова Рауза Асхатовна	начальник лаборатории Испытательного центра и экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, д.б.н. (по согласованию)
Воронова Татьяна Николаевна	заместитель генерального директора по качеству ЗАО «Московская фармацевтическая фабрика» (по согласованию)
Габидова Альфия Эркиновна	первый заместитель генерального директора ФГУП «Московский эндокринный завод», к.ф.н.
Грушевская Любовь Николаевна	ведущий научный сотрудник химико-технологической лаборатории опытно-технологического отдела ФГБУ НУ «Научно-исследовательский институт фармакологии им. В.В. Закусова», д.ф.н. (по согласованию)

Гунар Ольга Викторовна	начальник лаборатории микробиологии ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, д.ф.н. (по согласованию)
Денисова Елена Владимировна	заместитель директора Департамента развития фармацевтической и медицинской промышленности Министерства промышленности и торговли Российской Федерации (по согласованию)
Добрынин Валерий Павлович	главный аналитик отдела государственной фармакопеи и фармакопейного анализа ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, д.м.н. (по согласованию)
Евдокимова Ольга Владимировна	главный аналитик отдела государственной фармакопеи и фармакопейного анализа ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, д.ф.н., доцент (по согласованию)
Елизарова Татьяна Евгеньевна	генеральный директор ООО «Контрольно-аналитическая лаборатория фарманализ»,

	к.б.н. (по согласованию)
Емшанова Светлана Витальевна	начальник отдела научных разработок, заведующая лабораторией аналитической микроскопии Центра коллективного пользования (Научно-образовательный центр) ФГАОУ ВО «РУДН», д.ф.н, проф. (по согласованию)
Ермакова Галина Александровна	внештатный научный сотрудник отдела химии и технологии синтетических лекарственных средств акционерного общества «Всесоюзный научный центр по безопасности биологически активных веществ» (по согласованию)
Ершов Алексей Евгеньевич	начальник управления регистрации и медицинских исследований акционерного общества «Научно-производственное объединение по медицинским иммунобиологическим препаратам «Микроген» (по согласованию)
Жданова Мария Юрьевна	эксперт 1 категории лаборатории иммунологии Испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства

	здравоохранения Российской Федерации (по согласованию)
Жданова Оксана Сергеевна	ведущий аналитик отдела государственной фармакопеи и фармакопейного анализа и международного сотрудничества ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, к.б.н. (по согласованию)
Зыкова Татьяна Александровна	начальник отдела контроля качества Центра позитронно-эмиссионной томографии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова Министерства здравоохранения Российской Федерации, к.х.н. (по согласованию)
Каргина Татьяна Михайловна	ведущий аналитик отдела государственной фармакопеи и фармакопейного анализа Центра фармакопеи и международного сотрудничества ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, к.б.н. (по согласованию)
Карякин Александр Вадимович	заведующий лабораторией экспертизы, контроля и изучения качества,

	эффективности, безопасности препаратов крови, кровезаменителей и консервирующих растворов ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, д.м.н, проф. (по согласованию)
Коробицын Леонид Павлович	руководитель отдела клеточных культур ООО «Протеиновый контур», к.б.н. (по согласованию)
Ковалева Елена Леонардовна	заместитель директора Центра экспертизы и контроля готовых лекарственных средств ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, д.ф.н. (по согласованию)
Кодина Галина Евгеньевна	заведующая отделом радиационных технологий медицинского назначения ФГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации - федеральный медицинский биофизический центр им. А.И.Бурназяна», к.х.н. (по согласованию)
Комаров Александр Анатольевич	заместитель директора, руководитель испытательного центра, заведующий отделением фармакологических

	лекарственных средств, безопасности пищевой продукции и кормов ФГБУ «Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов, д.б.н., проф., (по согласованию)
Косенко Валентина Владимировна	заместитель руководителя Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения, к.ф.н., (по согласованию)
Кулешова Светлана Ивановна	начальник лаборатории антибиотиков Центра экспертизы и контроля готовых лекарственных средств ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, к.б.н. (по согласованию)
Ленева Ирина Анатольевна	заведующая лабораторией экспериментальной вирусологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, д.б.н., проф. (по согласованию)
Лякина Марина Николаевна	заместитель директора Центра фармакопеи и международного сотрудничества ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства

	здравоохранения Российской Федерации, д.ф.н. (по согласованию)
Маркарян Артем Александрович	председатель технического комитета по лекарственным средствам Росстандарта, д.ф.н.
Мирошниченко Юрий Владимирович	начальник кафедры военно-медицинского снабжения и фармации федерального государственного бюджетного военного образовательного учреждения высшего образования «Военно-медицинская академия имени С.М.Кирова» Министерства обороны Российской Федерации, главный провизор Министерства обороны Российской Федерации, д.ф.н., проф. (по согласованию)
Митькина Лидия Ивановна	начальник управления Центра экспертизы готовых лекарственных средств ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, д.ф.н. (по согласованию)
Михайлова Наталья Александровна	заместитель директора ФГБУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И.Мечникова», д.ф.н., проф. (по согласованию)

Мовсесянц Арташес Авакович	начальник Испытательного центра экспертизы качества ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, д.м.н., проф. (по согласованию)
Наркевич Игорь Анатольевич	ректор ФГБОУ высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, д.ф.н., проф. (по согласованию)
Невская Лариса Валерьевна	главный эксперт лаборатории иммунологии Испытательного центра экспертизы качества ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, к.м.н. (по согласованию)
Неугодова Наталья Петровна	начальник лаборатории фармакологии испытательного центра ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, к.б.н. (по согласованию)
Перелыгина	начальник лаборатории анатоксинов и

Ольга Викторовна	антитоксических препаратов Испытательного центра экспертизы качества ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, к.м.н. (по согласованию)
Потанина Ольга Георгиевна	директор центра научных исследований и разработок Центра коллективного пользования (Научно-образовательный центр) ФГАОУ ВО «РУДН», д.ф.н. (по согласованию)
Прокофьева Вера Ивановна	сотрудник кафедры фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М.Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации, д.ф.н., проф. (по согласованию)
Пятин Борис Михайлович	руководитель опытно-технического отдела ФГБУ «Научно-исследовательский институт имени В.В. Закусова», д.ф.н., проф. (по согласованию)
Родовниченко Анна Евгеньевна	начальник отдела регистрации лекарственных препаратов Департамента

	государственного регулирования обращения лекарственных средств Министерства здравоохранения Российской Федерации (по согласованию)
Рузиев Рамзес Джауланович	начальник лаборатории контроля радиофармпрепаратов и наборов реагентов для лабораторной диагностики сотрудничества ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, к.х.н. (по согласованию)
Садчикова Наталья Петровна	сотрудник кафедры фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М.Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации, д.ф.н., проф. (по согласованию)
Самылина Ирина Александровна	сотрудник кафедры фармацевтического естествознания ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М.Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский университет), д.ф.н., проф., член-корреспондент РАН (по

	согласованию)
Сенченко Сергей Петрович	начальник отдела разработки и актуализации фармакопейных статей на лекарственные средства синтетического происхождения Центра фармакопеи и международного сотрудничества ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, д.ф.н. (по согласованию)
Скачилова Софья Яковлевна	заведующая отделом химии и технологии ОАО «Всероссийского научного центра по безопасности биологически активных веществ», д.х.н., проф. (по согласованию)
Сокольская Татьяна Александровна	д.ф.н., проф. (по согласованию)
Терёшина Наталья Сергеевна	главный аналитик отдела государственной фармакопеи и фармакопейного анализа Центра фармакопеи и международного сотрудничества ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, д.ф.н. (по согласованию)
Титова	исполнительный директор некоммерческой

Лилия Викторовна	организации «Союз профессиональных фармацевтических организаций» (по согласованию)
Трифонова Ольга Брониславовна	директор по качеству и развитию ОАО «Красногорсклексредства» (по согласованию)
Флесюк Елена Владимировна	проректор по научной работе федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства Здравоохранения Российской Федерации, д.ф.н., проф. (по согласованию)
Хубиева Асият Юнусовна	заместитель директора Департамента государственного регулирования обращения лекарственных средств Министерства здравоохранения Российской Федерации, к.ф.н. (по согласованию)
Шестаков Владислав Николаевич	директор ФБУ «Государственный институт лекарственных средств и надлежащих практик» Министерства промышленности и торговли Российской Федерации (по согласованию)

Шилова Елена Владимировна	внештатный научный сотрудник отдела информационного обеспечения и контроля качества научных исследований АО «Всесоюзный научный центр по безопасности биологически активных веществ» (по согласованию)
Шустова Галина Николаевна	медицинский директор ОАО «Синтез», к.ф.н. (по согласованию)
Щепочкина Ольга Юрьевна	доцент кафедры фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М.Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский университет), к.ф.н. (по согласованию)
Эпштейн Наталья Борисовна	и.о. начальника фармацевтического центра практического обучения и компетенций «МИФИ», д.ф.н., проф. (по согласованию)

Организации, учреждения Российской Федерации и специалисты, принявшие участие в подготовке Государственной фармакопеи Российской Федерации XIV издания

1. Организации, учреждения России и специалисты, принявшие участие в составлении Государственной фармакопеи Российской Федерации XIV издания

Департамент государственного регулирования обращения лекарственных средств Министерства здравоохранения Российской Федерации

Романов Филипп Александрович – директор департамента

Саканян Карен Маисович – заместитель директора департамента, к.фарм.н.

Язоничева Наталья Александровна – референт департамента, к.фарм.н.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НЦЭСМП» МЗ РФ)

Олефир Юрий Витальевич – генеральный директор ФГБУ «НЦЭСМП», д.мед.н.

Меркулов Вадим Анатольевич – заместитель генерального директора, д.мед.н., проф.

Саканян Елена Ивановна – директор Центра фармакопеи и международного сотрудничества, д. фарм. н., проф.

Лякина Марина Николаевна – заместитель директора Центра фармакопеи и международного сотрудничества, д.фарм.н.

Шемерянкина Татьяна Борисовна – начальник отдела государственной фармакопеи и фармакопейного анализа Центра фармакопеи и международного сотрудничества, к.фарм.н.

Добрынин Валерий Павлович – главный аналитик отдела государственной фармакопеи и фармакопейного анализа Центра фармакопеи и международного сотрудничества, д.мед.н.

Осипова Ирина Григорьевна – главный аналитик отдела государственной фармакопеи и фармакопейного анализа Центра фармакопеи и международного сотрудничества, д.биол.н., проф.

Терёшина Наталья Сергеевна – главный аналитик отдела государственной фармакопеи и фармакопейного анализа Центра фармакопеи и международного сотрудничества, д.фарм.н.

Евдокимова Ольга Владимировна – главный аналитик отдела государственной фармакопеи и фармакопейного анализа Центра фармакопеи и международного сотрудничества, д.фарм.н., доцент

Сенченко Сергей Петрович – начальник отдела разработки и актуализации фармакопейных статей на лекарственные средства синтетического происхождения Центра фармакопеи и международного сотрудничества, д.фарм.н., доцент

Каргина Татьяна Михайловна – ведущий аналитик государственной фармакопеи и фармакопейного анализа Центра фармакопеи и международного сотрудничества, к.биол.н.

Старчак Юлия Анатольевна – главный аналитик отдела разработки и актуализации фармакопейных статей на лекарственные средства синтетического происхождения Центра фармакопеи и международного сотрудничества, д.фарм.н., доцент

Бармин Анатолий Вадимович – ведущий аналитик отдела разработки и актуализации фармакопейных статей на лекарственные средства

синтетического происхождения Центра фармакопеи и международного сотрудничества, к.биол.н.

Зайцев Сергей Анатольевич – ведущий аналитик отдела разработки и актуализации фармакопейных статей на лекарственные средства синтетического происхождения Центра фармакопеи и международного сотрудничества, к.хим.н.

Ярушок Татьяна Александровна – ведущий аналитик отдела разработки и актуализации фармакопейных статей на лекарственные средства синтетического происхождения Центра фармакопеи и международного сотрудничества, к.фарм.н.

Щетинин Пётр Павлович – ведущий аналитик отдела разработки и актуализации фармакопейных статей на лекарственные средства синтетического происхождения Центра фармакопеи и международного сотрудничества, к.биол.н.

Громаков Артём Сергеевич – аналитик отдела разработки и актуализации фармакопейных статей на лекарственные средства синтетического происхождения Центра фармакопеи и международного сотрудничества

Шишова Лидия Ивановна – ведущий аналитик отдела государственной фармакопеи и фармакопейного анализа Центра фармакопеи и международного сотрудничества

Бекетова Анастасия Викторовна – ведущий аналитик отдела государственной фармакопеи и фармакопейного анализа Центра фармакопеи и международного сотрудничества, к.фарм.н.

Ладыгина Лиана Александровна – аналитик 1 категории отдела разработки и актуализации фармакопейных статей на лекарственные средства синтетического происхождения Центра фармакопеи и международного сотрудничества

Постоюк Наталья Александровна – старший научный сотрудник отдела государственной фармакопеи и фармакопейного анализа Центра фармакопеи и международного сотрудничества, к.фарм.н.

Мочикина Ольга Алексеевна – научный сотрудник отдела государственной фармакопеи и фармакопейного анализа Центра фармакопеи и международного сотрудничества

Малкина Юлия Константиновна – младший научный сотрудник отдела государственной фармакопеи и фармакопейного анализа Центра фармакопеи и международного сотрудничества

Губарева Ольга Николаевна – начальник отдела международного сотрудничества Центра фармакопеи и международного сотрудничества

Алексеева Анастасия Сергеевна – научный сотрудник отдела государственной фармакопеи и фармакопейного анализа Центра фармакопеи и международного сотрудничества, к.фарм.н.

Ковалева Елена Леонардовна – заместитель директора Центра экспертизы и контроля готовых лекарственных средств, д.фарм.н.

Виноградова Наталья Андреевна – эксперт 2 категории управления экспертизы лекарственных средств № 1 Центра экспертизы и контроля готовых лекарственных средств

Митькина Лидия Ивановна – начальник управления экспертизы лекарственных средств № 4 Центра экспертизы и контроля готовых лекарственных средств, д.фарм.н.

Матвеева Оксана Анатольевна – начальника управления экспертизы лекарственных средств № 3 Центра экспертизы и контроля готовых лекарственных средств

Шаназаров Карим Сагамбаевич – главный эксперт управления экспертизы лекарственных средств № 3 Центра экспертизы и контроля готовых лекарственных средств, к.хим.н.

Прокопов Илья Алексеевич – главный эксперт управления экспертизы лекарственных средств № 3 Центра экспертизы и контроля готовых лекарственных средств, к.фарм.н.

Миронова Мария Михайловна – эксперт 1 категории управления экспертизы лекарственных средств № 3 Центра экспертизы и контроля готовых лекарственных средств

Баландина Ирина Анатольевна – начальник управления экспертизы лекарственных средств № 4 Центра экспертизы и контроля готовых лекарственных средств, д.фарм.н.

Фролова Лариса Николаевна – ведущий эксперт управления экспертизы лекарственных средств № 4 Центра экспертизы и контроля готовых лекарственных средств

Новиченко Анастасия Николаевна – эксперт 2 категории управления экспертизы лекарственных средств № 4 Центра экспертизы и контроля готовых лекарственных средств

Рукавицына Надежда Петровна – эксперт 2 категории управления экспертизы лекарственных средств № 4 Центра экспертизы и контроля готовых лекарственных средств, к.фарм.н.

Шелестова Валентина Васильевна – эксперт 1 категории управления экспертизы лекарственных средств № 4 Центра экспертизы и контроля готовых лекарственных средств, к.фарм.н.

Лутцева Анна Ивановна – начальника Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств, к.фарм.н.

Нечаева Екатерина Борисовна – заместитель начальника Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств, к.фарм.н.

Калита Наталья Федоровна – начальник лаборатории контроля радиофармпрепаратов и наборов реагентов для лабораторной диагностики

Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств, д.биол.н.

Кулешова Светлана Николаевна **–** начальник лаборатории антибиотиков Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств

Процак Светлана Александровна **–** главный эксперт лаборатории антибиотиков Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств

Боковикова Татьяна Николаевна – начальник лаборатории химико-фармацевтических препаратов № 1 Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств, д.фарм.н.

Герникова Евгения Петровна – главный эксперт лаборатории химико-фармацевтических препаратов № 1 Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств, к.фарм.н.

Стронова Лариса Александровна – главный эксперт лаборатории химико-фармацевтических препаратов № 1 Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств, к.фарм.н.

Попова Ольга Анатольевна – начальник лаборатории химико-фармацевтических препаратов № 2 Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств

Милкина Светлана Евгеньевна – главный эксперт лаборатории химико-фармацевтических препаратов № 2 Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств

Трухачева Людмила Андреевна – главный эксперт лаборатории химико-фармацевтических препаратов № 2 Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств

Кожемякина Людмила Леонидовна **–** инженер-лаборант лаборатории химико-фармацевтических препаратов № 2 испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств

Морзунова Татьяна Георгиевна – ведущий эксперт лаборатории биотехнологических препаратов Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств

Краюшкина Тамара Яковлевна – эксперт 1 категории контрольно-координационной лаборатории Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств

Ваганова Ольга Александровна – начальник лаборатории биотехнологических препаратов Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств, к.фарм.н.

Швец Сергей Витальевич – главный эксперт лаборатории биотехнологических препаратов Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств, к.хим.н.

Кузьмина Наталия Евгеньевна – начальник сектора спектральных методов анализа лаборатории биотехнологических препаратов Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств, к.хим.н.

Моисеев Сергей Владимирович – ведущий эксперт сектора спектральных методов анализа лаборатории биотехнологических препаратов Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств

Щукин Виктор Михайлович – ведущий эксперт сектора спектральных методов анализа лаборатории биотехнологических препаратов Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств

Шкарина Татьяна Николаевна – ведущий эксперт лаборатории биотехнологических препаратов Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств, к.фарм.н.

Антонова Наталья Петровна – начальник лаборатории фитопрепаратов и гомеопатических средств Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств, к.биол.н.

Шефер Елена Павловна **–** главный эксперт лаборатории фитопрепаратов и гомеопатических средств Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств, к.фарм.н.

Прохватилова Светлана Степановна **–** главный эксперт лаборатории фитопрепаратов и гомеопатических средств Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств, к.фарм.н.

Калинин Артем Михайлович **–** ведущий эксперт лаборатории фитопрепаратов и гомеопатических средств Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств

Семенова Наталья Евгеньевна **–** ведущий эксперт лаборатории фитопрепаратов и гомеопатических средств Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств

Кучугурин Сергей Александрович **–** эксперт 1 категории лаборатории фитопрепаратов и гомеопатических средств Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств

Витренко Елена Анатольевна **–** эксперт 1 категории лаборатории фитопрепаратов и гомеопатических средств Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств

Легонькова Ульяна Сергеевна **–** эксперт 1 категории лаборатории фитопрепаратов и гомеопатических средств Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств

Матвеенкова Татьяна Евгеньевна **–** эксперт 1 категории лаборатории фитопрепаратов и гомеопатических средств Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств

Замараева Любовь Николаевна **–** эксперт 1 категории лаборатории фитопрепаратов и гомеопатических средств Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств

Мастеркова Татьяна Вячеславовна – эксперт 1 категории лаборатории нанолекарств, препаратов для клеточной и генотерапии Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств

Моисеев Сергей Владимирович – эксперт 1 категории лаборатории нанолекарств, препаратов для клеточной и генотерапии Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств, к.хим.н.

Кутин Александр Аркадьевич – эксперт 1 категории лаборатории нанолекарств, препаратов для клеточной и генотерапии Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств

Крылов Владимир Игоревич – ведущий инженер категории лаборатории нанолекарств, препаратов для клеточной и генотерапии Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств

Середенко Вера Ивановна – начальник лаборатории витаминов, гормонов и синтетических аналогов Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств, к.хим.н.

Маслов Леонид Германович – главный эксперт лаборатории витаминов, гормонов и синтетических аналогов Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств, к.фарм.н.

Гунар Ольга Викторовна – начальник лаборатории микробиологии Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств, д.фарм.н.

Сахно Надежда Геннадьевна – главный эксперт лаборатории микробиологии Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств, к.фарм.н.

Новик Елена Самарьевна – ведущий эксперт лаборатории микробиологии Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств, к.биол.н.

Булгакова Галина Михайловна – ведущий эксперт лаборатории микробиологии Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств

Колосова Людмила Васильевна – эксперт 1 категории лаборатории микробиологии Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств

Буйлова Ирина Александровна – эксперт 1 категории лаборатории микробиологии Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств

Рощина Марина Владимировна – эксперт 1 категории лаборатории микробиологии Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств

Доренская Анна Викторовна – эксперт 1 категории лаборатории микробиологии Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств

Рузиев Рамзес Джауланович – начальник лаборатории контроля радиофармпрепаратов и наборов реагентов для лабораторной диагностики Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств, к.хим.н

Мовсесянц Арташес Авакович – начальник испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов Испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов, д.мед.н., проф.

Устинникова Ольга Борисовна – начальник лаборатории биохимии медицинских иммунобиологических препаратов Испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов, к.биол.н

Арефьева Екатерина Михайловна – эксперт 2 категории лаборатории биохимии медицинских иммунобиологических препаратов Испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов

Волкова Рауза Асхатовна – начальник лаборатории молекулярно-биологических и генетических методов испытаний Испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов, д.биол.н.

Шимчук Людмила Федоровна – начальник лаборатории организации испытаний медицинских иммунобиологических препаратов Испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов, к.биол.н.

Кудашева Эльвира Юрьевна – начальник лаборатории иммуноглобулинов и препаратов крови Испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов, к.мед.н.

Гайдерова Лидия Александровна – начальник лаборатории иммунологии Испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов, к. мед.н.

Лобанова Татьяна Николаевна – ведущий эксперт лаборатории иммунологии Испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов, к.мед.н.

Щербаченко Ирина Михайловна – эксперт 1 категории лаборатории иммунологии Испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов, к.мед.н.

Байкова Марина Леонидовна – микробиолог 1 категории лаборатории иммунологии Испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов

Медуницын Николай Васильевич – главный научный сотрудник отдела научно-методического обеспечения экспертизы лекарственных средств и медицинских иммунобиологических препаратов Испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов, д.мед.н., проф., акад. РАН

Рунова Ольга Борисовна – главный эксперт лаборатории биохимии медицинских иммунобиологических препаратов Испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов, к.биол.н.

Неугодова Наталия Петровна – начальник лаборатории фармакологии Испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов, к.биол.н.

Батуашвили Тамара Ариеловна – главный эксперт лаборатории фармакологии Испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов, к.биол.н.

Симутенко Людмила Васильевна – ведущий эксперт лаборатории фармакологии Испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов, к.биол.н.

Сапожникова Галина Алексеевна – ведущий эксперт лаборатории фармакологии Испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов

Шаповалова Ольга Владимировна – ведущий эксперт лаборатории фармакологии Испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов

Шадрин Павел Валерьевич – эксперт 1 категории лаборатории фармакологии Испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов

Давыдов Дмитрий Сергеевич – начальник лаборатории бактериофагов и препаратов нормофлоры с коллекцией микроорганизмов Испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов, к.биол.н.

Евлашкина Вера Францевна – ведущий эксперт лаборатории бактериофагов и препаратов нормофлоры с коллекцией микроорганизмов

Испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов, к.биол.н.

Парфенюк Римма Леонтьевна – ведущий эксперт лаборатории бактериофагов и препаратов нормофлоры Испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов, к.биол.н.

Дурманова Зоя Владимировна – инженер-лаборант 1 категории Лаборатория бактериофагов и препаратов нормофлоры с коллекцией микроорганизмов Испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов

Лебедева Юлия Николаевна – эксперт 1 категории лаборатории иммунологии Испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов

Суханова Светлана Михайловна – начальник лаборатории бактериологических питательных сред и культур клеток Испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов, к.биол.н.

Бердникова Зинаида Евтропьевна – ведущий эксперт лаборатории бактериологических питательных сред и культур клеток Испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов, к.биол.н.

Исаева Ирина Владимировна – руководитель лаборатории контроля качества биотехнологических препаратов Испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов, д.фарм.н.

Невская Лариса Валерьевна – ведущий эксперт лаборатория иммунологии Испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов, к.биол.н.

Жданова Мария Юрьевна – эксперт 1 категории лаборатории иммунологии Испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов

Петручук Елена Мидатовна – эксперт 1 категории лаборатории вирусных вакцин Испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов, к.мед.н.

Мухачева Анастасия Вячеславовна – эксперт 1 категории лаборатории вирусных вакцин Испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов

Майская Людмила Михайловна – ведущий эксперт лаборатории бактериофагов и препаратов нормофлоры Испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов, к.мед.н.

Ладыгина Александра Владимировна - эксперт 1 категории лаборатории бактериофагов и препаратов нормофлоры с коллекцией микроорганизмов Испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов, к.биол.н.

Перелыгина Ольга Викторовна – начальник лаборатории анатоксинов и антитоксических препаратов Испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов, к.мед.н.

Корнилова Ольга Геннадьевна – ведущий эксперт лаборатории иммуноглобулинов и препаратов крови Испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов, к.мед.н.

Эльберт Елизавета Игоревна – ведущий эксперт лаборатории молекулярно-биологических и генетических методов испытаний Испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов, к.биол.н.

Алпатова Наталья Александровна – главный эксперт лаборатории иммунологии Испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов, к.мед.н.

Долин Юрий Спиридонович – эксперт 1 категории лаборатории анатоксинов и антитоксических препаратов Испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов

Матвеева Наталья Ивановна – эксперт 1 категории лаборатории анатоксинов и антитоксических препаратов Испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов, к.биол.н.

Слабова Ольга Ивановна – эксперт 1 категории лаборатории анатоксинов и антитоксических препаратов Испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов, к.биол.н.

Алексеева Ирина Андреевна – главный эксперт лаборатории анатоксинов и антитоксических препаратов Испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов, к.мед.н.

Фадейкина Ольга Васильевна – ведущий технолог лаборатория бактериофагов и препаратов нормофлоры с коллекцией микроорганизмов Испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов

Смирнова Надежда Евгеньевна – эксперт 1 категории лаборатории иммуноглобулинов и препаратов крови Испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов, к.мед.н.

Юнасова Татьяна Николаевна – главный эксперт лаборатории вирусных вакцин Испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов, к.мед.н.

Терешкина Наталья Васильевна – эксперт 1 категории лаборатории вирусных вакцин Испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов, к.мед.н.

Малкова Виктория Игоревна – эксперт 1 категории лаборатории биохимии медицинских иммунобиологических препаратов Испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов

Коротков Михаил Геннадьевич – ведущий эксперт лаборатории биохимии медицинских иммунобиологических препаратов Испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов, к.биол.н.

Величко Елена Викторовна – главный технолог Испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов, к.хим.н.

Томилин Владимир Андреевич – эксперт 1 категории лаборатории молекулярно-биологических и генетических методов испытаний Испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов

Сухно Анатолий Сергеевич – эксперт 1 категории лаборатории молекулярно-биологических и генетических методов испытаний Испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов

Колесникова Оксана Николаевна – старший лаборант лаборатории биохимии медицинских иммунобиологических препаратов Испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов

Голубенко Ирина Анатольевна – эксперт 1 категории лаборатории бактериологических питательных сред и культур клеток Испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов, к.биол.н.

Конду Эмма Ильинична – эксперт 1 категории лаборатории бактериологических питательных сред и культур клеток Испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов, к.биол.н.

Захарова Наталья Евгеньевна – главный эксперт лаборатории бактериологических питательных сред и культур клеток Испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов, к.биол.н.

Комаровская Елена Игоревна – эксперт 1 категории лаборатории анатоксинов и антитоксических препаратов Испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов

Кривых Максим Андреевич – эксперт 2 категории лаборатории иммуноглобулинов и препаратов крови Испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов

Постнова Евгения Леонидовна – эксперт 1 категории лаборатория вирусных вакцин Испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов, к.биол.н.

Саркисян Каринэ Арташесовна – начальник лаборатории вирусных вакцин Испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов, к.мед.н.

Алексеева Светлана Александровна **–** эксперт 1 категории лаборатории бактериальных вакцин Испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов, к.биол.н.

Тарасов Андрей Павлович – эксперт 1 категории лаборатории бактериальных вакцин Испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов, к.мед.н.

Строганова Марина Константиновна – ведущий эксперт лаборатории анатоксинов и антитоксических препаратов Испытательного

центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов, к.мед.н.

Касина Ирина Владимировна – ведущий эксперт лаборатории бактериальных вакцин Испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов, к.мед.н.

Немировская Татьяна Ивановна – начальник лаборатории бактериальных вакцин Испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов, к.мед.н.

Ковтун Валентина Петровна – ведущий эксперт лаборатории бактериальных вакцин Испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов, к.мед.н.

Абрамцева Марина Витальевна – эксперт 2 категории лаборатории бактериальных вакцин Испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов

Александрова Наталья Владимировна – главный эксперт лаборатории бактериальных вакцин Испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов, к.мед.н.

Подлипаева Ирина Владимировна – инженер-лаборант 1 категории лаборатории бактериальных вакцин Испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов

Шитикова Ольга Юрьевна – эксперт 2 категории лаборатории вирусных вакцин Испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов

Бутырский Алексей Юрьевич – эксперт 1 категории центра по борьбе с бешенством Испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов

Мефед Кирилл Михайлович – ведущий эксперт лаборатории вирусных вакцин Испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов, к.биол.н.

Хамитова Медина Фагимовна – ведущий эксперт лаборатории вирусных вакцин Испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов, к.мед.н.

Карпова Елена Викторовна – ведущий эксперт лаборатории вирусных вакцин Испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов, к.мед.н.

Бархалева Оксана Александровна – ведущий эксперт лаборатории вирусных вакцин Испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов, к.биол.н.

Ладыженская Ирина Павловна – ведущий эксперт лаборатории вирусных вакцин Испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов, к.мед.н.

Мамонтова Татьяна Владимировна – ведущий эксперт лаборатории вирусных вакцин Испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов, к.мед.н.

Бондарев Владимир Петрович – директор Центра экспертизы и контроля медицинских иммунобиологических препаратов, д.мед.н., проф.

Радунская Стелла Филлипповна – главный эксперт управления экспертизы аллергенов, цитокинов и других иммуномодуляторов Центра экспертизы и контроля медицинских иммунобиологических препаратов, к.мед.н.

Авдеева Жанна Ильдаровна – главный эксперт управления экспертизы аллергенов, цитокинов и других иммуномодуляторов Центра экспертизы и контроля медицинских иммунобиологических препаратов, д.мед.н., проф.

Лаптева Людмила Констатиновна – главный эксперт управления экспертизы аллергенов, цитокинов и других иммуномодуляторов Центра экспертизы и контроля медицинских иммунобиологических препаратов, к.биол.н.

Лавренчик Елена Ивановна – ведущий эксперт управления экспертизы аллергенов, цитокинов и других иммуномодуляторов Центра экспертизы и контроля медицинских иммунобиологических препаратов, к.мед.н.

Дарбеева Ольга Сергеевна – главный эксперт управления экспертизы противобактериальных медицинских иммунобиологических препаратов Центра экспертизы и контроля медицинских иммунобиологических препаратов, к.мед.н.

Чупринина Раиса Павловна – главный эксперт управления экспертизы противобактериальных медицинских иммунобиологических препаратов Центра экспертизы и контроля медицинских иммунобиологических препаратов, д.мед.н.

Озерецковский Николай Аркадьевич – главный эксперт управления экспертизы противобактериальных медицинских иммунобиологических препаратов Центра экспертизы и контроля медицинских иммунобиологических препаратов, к.мед.н.

Шалунова Нина Васильевна – главный эксперт управления экспертизы противовирусных медицинских иммунобиологических препаратов Центра экспертизы и контроля медицинских иммунобиологических препаратов, д.мед.н.

Леви Диана Тимофеевна – главный эксперт управление экспертизы противобактериальных медицинских иммунобиологических препаратов Центра экспертизы и контроля медицинских иммунобиологических препаратов, д.мед.н., проф.

Саяпина Лидия Васильевна – главный эксперт управление экспертизы, противобактериальных медицинских иммунобиологических препаратов Центра экспертизы и контроля медицинских иммунобиологических препаратов, д.мед.н.

Соловьев Евгений Анатольевич – заместитель начальника управления экспертизы противобактериальных медицинских иммунобиологических

препаратов Центра экспертизы и контроля медицинских иммунобиологических препаратов

Лонская Наталья Ивановна – главный эксперт управления экспертизы противовирусных медицинских иммунобиологических препаратов Центра экспертизы и контроля медицинских иммунобиологических препаратов, к.мед.н.

Воробьева Майя Сергеевна – главный эксперт управления экспертизы противовирусных медицинских иммунобиологических препаратов Центра экспертизы и контроля медицинских иммунобиологических препаратов, д.мед.н., проф.

Перекрест Валентина Васильевна – ведущий эксперт управления экспертизы противовирусных медицинских иммунобиологических препаратов Центра экспертизы и контроля медицинских иммунобиологических препаратов, к.мед.н.

Кукес Владимир Григорьевич – директор Центра клинической фармакологии, д.мед.н., проф., академик РАМН, заслуженный деятель науки РФ, лауреат премии Правительства РФ

Чеча Ольга Александровна – старший научный сотрудник отдела клинической фармакокинетики Центра клинической фармакологии, к.биол.н.

Горошко Ольга Александровна – старший научный сотрудник отдела клинической фармакокинетики Центра клинической фармакологии

Борисевич Игорь Владимирович - директор Центра планирования и координации научно-исследовательских работ, д.мед.н., проф.

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГАОУ ВО

«Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России» (Сеченовский Университет)

Пятигорская Наталья Валерьевна **–** заместитель директора по научной работе Научно-исследовательского института фармации, заведующая учебной частью кафедры промышленной фармации, д.фарм.н., проф.

Самылина Ирина Александровна – профессор кафедры фармацевтического естествознания, д.фарм.н., проф., член-корр. РАН

Дементьева Наталья Николаевна – заведующая лабораторией фармацевтической химии Научно-исследовательского института фармации, д.фарм.н., проф., академик МАИ

Бобкова Наталья Владимировна – заведующая учебной частью кафедры фармакогнозии, д.фарм.н., доцент

Завражная Тамара Александровна – ведущий научный сотрудник лаборатории анализа и технологии Научно-исследовательского института фармации, к.фарм.н.

Зрелова Любовь Всеволодовна – старший научный сотрудник лаборатории анализа и технологии Научно-исследовательского института фармации, д.хим.н.

Рудакова Инна Павловна – главный научный сотрудник отдела разработки лекарственных средств лаборатории анализа и технологии Научно-исследовательского института фармации, профессор кафедры промышленной фармации Института профессионального образования, д.хим.н.

Мелентьева Галина Андреевна – главный научный сотрудник лаборатории фармакопеи Научно-исследовательского института фармации, д.хим.н.

Ильина Ирина Георгиевна – старший научный сотрудник лаборатории анализа и технологии Научно-исследовательского института фармации, к.хим.н.

Молчан Нина Валерьевна – старший научный сотрудник лаборатория анализа и технологии отдела разработки лекарственных средств Научно-исследовательского института фармации, к.фарм.н.

Костенникова Зинаида Петровна – д.фарм.н., проф.

Радченко Юлия Николаевна – старший научный сотрудник Научно-исследовательского института фармации

Сорокина Алла Анатольевна – главный научный сотрудник лаборатории анализа и технологии Научно-исследовательского института фармации, профессор кафедры фармакогнозии, д.фарм.н.

Гравель Ирина Валерьевна – ведущий научный сотрудник лаборатории анализа и технологии Научно-исследовательского института фармации, профессор, ученый секретарь кафедры фармакогнозии, доцент, д.фарм.н.

Терёшкина Ольга Ивановна – заведующая лабораторией анализа и технологии Научно-исследовательского института фармации, ученый секретарь НИИФ, к.фарм.н.

Попов Дмитрий Матвеевич – главный научный сотрудник лаборатории фармакогнозии Научно-исследовательского института фармации, д. фарм.н., проф., академик МАИ

Грачев Сергей Витальевич – директор Научно-исследовательского института молекулярной медицины, заведующий кафедрой патологии, профессор лаборатории экстремальных состояний, академик РАМН, академик-секретарь секции наук о Человеке Международной академии наук Высшей школы (МАН ВШ), член Российской секции международной академии наук

Краснюк Иван Иванович – декан фармацевтического факультета, заведующий кафедрой фармацевтической технологии, д. фарм. н., проф.

Раменская Галина Владиславовна – заведующая кафедрой фармацевтической и токсикологической химии фармацевтического факультета им. А.П. Арзамасцева, д. фарм. н., проф.

Садчикова Наталья Петровна – профессор кафедры фармацевтической и токсикологической химии фармацевтического факультета им. А.П. Арзамасцева, д.фарм.н.

Арзамасцев Александр Павлович **–** профессор фармацевтического факультета, д.фарм.н., академик РАМН

Сапронова Наталья Николаевна - доцент кафедры фармакогнозии фармацевтического факультета, к.фарм.н.

Голубева Ирина Сергеевна – аспирант кафедры фармакогнозии фармацевтического факультета, к.фарм.н.

Евграфов Александр Александрович – заведующий учебной частью кафедры химии медико-профилактического факультета, к.фарм.н., доцент

Маркарян Артем Александрович – заведующий кафедрой фармации Института профессионального образования, д.фарм.н., проф.

Сологова Сусанна Сергеева – доцент кафедры фармакологии, к.биол.н.

Баева Вера Михайловна – профессор кафедры фармацевтического естествознания, д.фарм.н.

Печенников Валерий Михайлович – доцент кафедры фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева, к.фарм.н.

Щепочкина Ольга Юрьевна – доцент кафедры фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева, к.фарм.н.

Власов Александр Михайлович – доцент кафедры фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева, к.фарм.н.

Родионова Галина Михайловна – доцент кафедры фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева, к.фарм.н.

Смирнов Валерий Валерьевич – доцент кафедры фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева, к.фарм.н.

Акашкина Людмила Владимировна – д.фарм.н., проф.

Цуканов Юрий Васильевич – к.фарм.н., доцент

Кабалоева Диана Руслановна – к.фарм.н., доцент

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Информационно-методический центр по экспертизе, учету и анализу обращения средств медицинского применения» Росздравнадзора (ФГБУ «ИМЦЭУАОСМП» Росздравнадзора)

Титова Анна Васильевна – начальник отдела организации контроля качества лекарственных средств, д.фарм.н., проф.

Родионова Оксана Евгеньевна – главный специалист группы БИК спектроскопии отдела организации контроля качества лекарственных средств, д.физ.-мат.н.

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России)

Иващенко Нина Васильевна **–** заведующая кафедрой организации фармацевтической деятельности ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава РФ, к.фарм.н., доцент

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов» (ФГАОУ ВО РУДН)

Филиппов Владимир Михайлович **–** ректор РУДН, д.физ.-мат.н., проф., академик Российской академии образования

Плетнева Татьяна Вадимовна **–** заведующая кафедрой фармацевтической и токсикологической химии, д.хим.н., проф.

Попов Павел Игоревич **–** ассистент кафедры фармацевтической и токсикологической химии, провизор-аналитик, к.биол.н.

Абрамович Римма Александровна **–** директор Центра коллективного пользования (Научно-образовательного центра), д.фарм.н., доцент

Потанина Ольга Георгиевна **–** директор центра научных исследований и разработок Центра коллективного пользования (Научно-образовательного центра), д.фарм.н., проф.

Емшанова Светлана Витальевна **–** начальник отдела научных разработок Центра коллективного пользования (Научно-образовательного центра), д.фарм.н.

Васильева Елена Александровна **–** доцент кафедры микробиологии и вирусологии, к.мед.н.

Аллилуев Александр Павлович **–** старший научный сотрудник, заведующий лабораторией кафедры общей патологии и патологической физиологии, к.мед.н.

Горяинов Сергей Владимирович **–** заведующий лабораторией масс-спектрометрии высокого разрешения и спектроскопии ЯМР Центра презиционных инструментальных методов анализа «Прима» (ЦКП (НОЦ) РУДН

Никулин Александр Владимирович **–** заведующий лабораторией физико-химических методов исследования Испытательного центра Центра контроля качества лекарственных средств ЦКП (НОЦ) РУДН, к.хим.н.

Воробьев Александр Николаевич **–** заведующий лабораторией промышленной фармацевтической технологии Центра научных исследований и разработок ЦНИР ЦКП (НОЦ) РУДН, к.фарм.н.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Московский государственный университет тонких химических технологий имени М.В. Ломоносова» (МИТХТ им. М.В. Ломоносова)

Финкельштейн Евгений Иосифович - руководитель лаборатории контроля качества лекарственных средств "БИОЛЕК" при кафедре биотехнологии и бионанотехнологии, д.хим.н., проф.

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (НИУ «БелГУ»)

Полухин Олег Николаевия - ректор, д.полит.н., проф.

Дятченко Леонид Яковлевич – руководитель межвузовской научной лабораторией по проблемам социально-технологической культуры современного общества как феномена XXI века, д.социол.н., проф.

Писарев Дмитрий Иванович – доцент кафедры фармацевтической химии и фармакогнозии, д.фарм.н.

Новиков Олег Олегович – заведующий кафедрой фармацевтической химии и фармакогнозии, д.фарм.н., проф.

Жилякова Елена Теодоровна – заведующая кафедрой фармацевтической технологии, д.фарм.н., проф.

Новикова Марина Юрьевна – доцент кафедры фармацевтической технологии, к.фарм.н.

Безменова Марина Дмитриевна – аспирант кафедры фармацевтической химии и фармакогнозии

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России)

Мустафин Ильшат Ганиевич **–** проректор по научной и инновационной работе, проф.

Абдуллина Светлана Геннадьевна **–** профессор кафедры фармацевтической химии с курсами аналитической и токсикологической химии, д.фарм.н.

Калинкина Елена Александровна **–** соискатель кафедры фармацевтической химии с курсами аналитической и токсикологической химии

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт химической физики им. Н.Н. Семенова» Российской академии наук (ИХФ РАН)

Родионова Оксана Евгеньевна – ведущий научный сотрудник, д.физ.-мат.н.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный океанографический институт имени Н.Н.Зубова» (ФГБУ "ГОИН")

Сыроешкин Антон Владимирович – заведующий лабораторией прикладной гидрохимии и аналитической химии, д.биол.н.

Государственное бюджетное образовательное учреждение «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И.Евдокимова» Минздрава России

Берлянд Александр Семенович **–** заведующий кафедрой общей и биоорганической химии, д. хим.н., проф., член-корреспондент Международной академии наук информатизации, информационных процессов и технологий

Федеральное государственное унитарное предприятие «Всероссийский научно-исследовательский институт физико-технических и радиотехнических измерений» (ФГУП «ВНИИФТРИ»)

Лесников Евгений Васильевич **–** ведущий научный сотрудник, к.физ.-мат.н.

Федеральное бюджетное учреждение «Государственный институт лекарственных средств и надлежащих практик» (ФБУ «ГИЛСиНП»)

Мазов Михаил Юрьевич **–** заместитель директора, к.хим.н.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России (ФГБОУ ВО СПХФУ)

Наркевич Игорь Анатольевич **–** ректор, д.фарм.н., проф.

Яковлев Геннадий Павлович **–** профессор кафедры фармакогнозии, д.биол.н.

Алексеева Галина Михайловна – заведующая кафедрой аналитической химии, к.хим.н., доцент

Яковлев Константин Иванович **–** доцент кафедры аналитической химии, к.хим.н.

Стрелова Ольга Юрьевна – заведующая кафедрой фармацевтической химии, к.хим.н., доцент

Блинова Мария Петровна **–** старший преподаватель кафедры фармацевтической химии

Криштанова Надежда Александровна **–** доцент кафедры фармацевтической химии, к.фарм.н.

Марченко Алексей Леонидович **–** доцент кафедры промышленной технологии лекарственных препаратов, к.фарм.н.

Вайнштейн Виктор Абрамович **–** профессор кафедры промышленной технологии лекарственных препаратов, д.фарм.н.

Скляревская Нелли Владимировна **–** доцент кафедры фармакогнозии, к.фарм.н.

Мистрова Анастасия Алексеевна **–** старший преподаватель кафедры фармакогнозии, к.фарм.н.

Повыдыш Мария Николаевна **–** доцент кафедры фармакогнозии, д.биол.н**.**

Фомина Людмила Ивановна **–** доцент кафедры фармакогнозии, к.биол.н**.**

Белодубровская Галина Александровна **–** доцент кафедры фармакогнозии, к.фарм.н.

Гончаров Михаил Юрьевич **–** доцент кафедры фармакогнозии, к.фарм.н.

Пряхина Нина Ивановна **–** доцент кафедры фармакогнозии, к.фарм.н.

Дудецкая Наталья Александровна **–** старший преподаватель кафедры фармакогнозии, к.фарм.н.

Ефимова Ксения Николаевна **–** старший преподаватель кафедры фармакогнозии, к.фарм.н.

Жохова Елена Владимировна **–** доцент кафедры фармакогнозии, к.фарм.н.

Харитонова Нина Петровна – доцент кафедры фармакогнозии, к.фарм.н.

Клемпер Алексей Владимирович – доцент кафедры фармакогнозии, к.фарм.н.

Лужанин Владимир Геннадьевич – и.о. заведующего кафедрой фармакогнозии, к.биол.н.

Теслов Леонид Степанович – доцент кафедры фармакогнозии, к.фарм.н.

Бабушкина Евгения Викторовна – старший преподаватель кафедры фармакогнозии

Котова Надежда Ивановна – доцент кафедры фармацевтической химии, к.фарм.н.

Яковлев Игорь Павлович – заведующий кафедрой органической химии, д.хим.н., проф.

Каухова Ирина Евгеньевна – заведующая кафедрой промышленной технологии лекарственных препаратов, д.фарм.н., проф.

Громова Лидия Ивановна – к.хим.н.

Басевич Анна Викторовна – доцент кафедры промышленной технологии лекарственных препаратов, к.фарм.н.

Ананьева Елена Павловна – заведующая кафедрой микробиологии, к.биол.н., доцент

Гурина Светлана Владимировна – доцент кафедры микробиологии, к.биол.н.

Спасенкова Ольга Михайловна – доцент кафедры биохимии, к.мед.н.

Кириллова Надежда Васильевна – заведующая кафедрой биохимии, д.биол.н.,проф.

Венникас Ольга Ричардовна – доцент кафедры биохимии, к.биол.н.

Тихомирова Ольга Михайловна – доцент кафедры микробиологии, к.биол.н.

Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ПМФИ - филиал ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России)

Аджиенко Всеволод Леонидович – директор Пятигорского медико-фармацевтического института

Вергейчик Евгений Николаевич **–** д.фарм.н., проф., заслуженный работник здравоохранения РФ

Денисенко Олег Николаевич – заведующий кафедрой фармации факультета последипломного образования, д. фарм.н., проф.

Серебряная Фатима Казбековна – доцент кафедры ботаники, к.фарм.н.

Ляшенко Светлана Сергеевна – старший преподаватель кафедры фармации факультета последипломного образования, к.фарм.н.

Шамилов Арнольд Алексеевич – старший преподаватель кафедры фармакогнозии, к.фарм. н.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России)

Одегова Татьяна Федоровна – заведующая кафедрой микробиологии, д.фарм.н., проф.

Белоногова Валентина Дмитриевна – заведующая кафедрой фармакогнозии с курсом ботаники, д.фарм.н., проф.

Печерская Людмила Григорьевна – доцент кафедры фармакогнозии с курсом ботаники

Галишевская Елена Евгеньевна **–** доцент кафедры фармакогнозии с курсом ботаники, к.фарм.н.

Соснина Светлана Анатольевна **–** старший преподаватель кафедры фармакогнозии с курсом ботаники, к.фарм.н.

Турышев Алексей Юрьевич **–** доцент кафедры фармакогнозии с курсом ботаники, декан факультета заочного обучения, к.фарм.н.

Коротков Илья Викторович **–** доцент кафедры фармакогнозии с курсом ботаники, заместитель декана факультета подготовки иностранных граждан, к.фарм.н.

Абызова Екатерина Олеговна **–** аспирант кафедры фармакогнозии с курсом ботаники

Согрина Анна Николаевна **–** аспирант кафедры фармакогнозии с курсом ботаники

Иванова Галина Анатольевна **–** старший преподаватель кафедры фармакогнозии с курсом ботаники, к.фарм.н.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России)

Котельников Геннадий Петрович **–** ректор, академик РАМН, лауреат Государственной премии РФ и дважды лауреат премии Правительства РФ, заслуженный деятель науки РФ, д. мед.н., проф.

Куркин Владимир Александрович **–** заведующий кафедрой фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии, д.фарм.н., проф.

Куркина Анна Владимировна **–** доцент кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии, д.фарм.н.

Рыжов Виталий Михайлович **–** старший преподаватель кафедрой фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии, к.фарм.н.

Тарасенко Любовь Владимировна – ассистент кафедрой фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии

Стеняева Виктория Викторовна – ассистент кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии, к.фарм.н.

Авдеева Елена Владимировна – заместитель директора Института инновационного развития, доцент кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии, д.фарм.н., проф.

Егоров Максим Валерьевич – доцент кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии, к.фарм.н.

Браславский Валерий Борисович - доцент кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии, д.фарм.н.

Правдивцева Ольга Евгеньевна – доцент кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии д.фарм.н.

Егорова Анна Владимировна – аспирант кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии, к.фарм.н.

Шмыгарева Анна Анатольевна – аспирант кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии, к.фарм.н.

Акушская Алина Сергеевна – аспирант кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии

Хусаинова Алия Ильясовна – очный аспирант кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии

Рязанова Татьяна Константиновна – аспирант кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии

Зайцева Надежда Вячеславовна – аспирант кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии

Вельмяйкина Екатерина Ивановна – аспирант кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии, к.фарм.н.

Зимина Любовь Николаевна – аспирант кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии, к. фарм.н.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет» (ФГБОУ ВО «ВГУ» Минздрава России)

Сливкин Алексей Иванович **–** декан фармацевтического факультета, заведующий кафедрой фармацевтической химии и фармацевтической технологии. д.фарм.н., проф.

Мальцева Алевтина Алексеевна **–** доцент кафедры управления и экономики фармации и фармакогнозии фармацевтического факультета, к.фарм.н.

Чистякова Анна Сергеевна **–** ассистент кафедры фармацевтической химии и фармацевтической технологии, к.фарм.н.

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ГБОУ ВПО КГМУ Минздрава России)

Бубенчикова Валентина Николаевна – заведующая кафедрой фармакогнозии и ботаники, д.фарм.н., проф.

Дроздова Ирина Леонидовна **–** профессор кафедры фармакогнозии и ботаники, д.фарм.н.

Сухомлинов Юрий Анатольевич **–** доцент кафедры фармакогнозии и ботаники, к.фарм.н.

Кондратова Юлия Александровна **–** старший преподаватель кафедры фармакогнозии и ботаники, к.фарм.н.

Бубенчиков Роман Александрович **–** ассистент кафедры фармакогнозии и ботаники, д.фарм.н.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России)

Калинкина Галина Ильинична – заведующая кафедрой фармакогнозии с курсами ботаники и экологии, д.фарм.н., проф.

Коломиец Наталья Эдуардовна – профессор кафедры фармакогнозии с курсами ботаники и экологии, д.фарм.н.

Андреева Валерия Юрьевна – доцент кафедры фармакогнозии с курсами ботаники и экологии, к.биол.н.

Исайкина Надежда Валентиновна – старший преподаватель кафедры фармакогнозии с курсами ботаники и экологии, к.фарм.н.

Федько Ирина Валерьевна – старший преподаватель кафедры фармакогнозии с курсами ботаники и экологии, заместитель декана фармацевтического факультета, к.фарм.н.

Полуэктова Татьяна Викторовна – старший преподаватель кафедры фармакогнозии с курсами ботаники и экологии, к.фарм.н.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Дальневосточный государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО ДВГМУ Минздрава России)

Степанова Татьяна Алексеевна – профессор кафедры фармации и фармакологии, д.фарм.н., проф.

Федеральное унитарное государственное предприятие «Государственный научный центр по антибиотикам» (ГНЦА)

Долгова Галина Владимировна – руководитель сектора фармакологии, к.биол.н.

Юркевич Александр Морисович **–** ведущий научный сотрудник, д.хим.н., проф.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова Сибирского отделения Российской академии наук (НИОХ СО РАН):

Морозов Сергей Владимирович **–** заведующий лабораторией экологических исследований и хроматографических методов анализа, к.хим.н.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Российский онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина» (НИИ ЭДиТО ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н.Блохина» РАМН)

Краснова Маргарита Андреевна **–** ведущий инженер отделения изучения новых противоопухолевых лекарств с однодневным стационаром амбулаторной химиотерапии, к. фарм.н.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук (ИБХ РАН)

Мирошников Анатолий Иванович **–** заместитель директора ИБХ РАН, д.хим.н., академик

Федеральное государственное бюджетное военное образовательное учреждение высшего образования «Военно-медицинская академия им.С.М.Кирова» Министерства обороны Российской Федерации

Мирошниченко Юрий Владимирович – заместитель начальника Военно-медицинской академии, главный специалист по лекарственному

обеспечению Министерства Обороны Российской Федерации, заслуженный работник здравоохранения Российской Федерации, д.фарм.н., проф.

Еникеева Римма Александровна **–** доцент кафедры военно-медицинского снабжения и фармации, к.фарм.н.

Государственное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений» Российской академии сельскохозяйственных наук (ГНУ ВИЛАР Россельхозакадемии)

Сокольская Татьяна Александровна **–** д.фарм.н., проф.

Богачева Надежда Гавриловна **–** руководитель группы фармакогнозии отдела стандартизации и сертификации ВИЛАР, к.фарм.н.

Сайбель Ольга Леонидовна **–** руководитель центра химии и фармацевтической технологии, к.фарм.н.

Коняева Елена Анатольевна **–** старший научный сотрудник группы фармакогнозии

Алентьева Оксана Геннадьевна **–** старший научный сотрудник группы фармакогнозии

Даргаева Тамара Дарижаповна **–** главный научный сотрудник отдела стандартизации и сертификации, д.фарм.н., проф.

Шейченко Владимир Иванович – ведущий научный сотрудник отдела стандартизации и сертификации, к.хим.н.

Кирьянов Александр Александрович **–** ведущий научный сотрудник отдела стандартизации, к.фарм.н.

Охотникова Валентина Федоровна **–** ведущий научный сотрудник отдела стандартизации и сертификации, к.фарм.н.

Копытько Янина Федоровна **–** ведущий научный сотрудник отдела стандартизации и сертификации, к.фарм.н.

Кабишев Константин Эдуардович – докторант отдела фармацевтической технологии, д.фарм.н.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» Российской академии медицинских наук (ФГБУ «НИИВС им. И.И.Мечникова» РАМН)

Михайлова Наталья Александровна – заместитель директора института по научной работе, д.мед.н., проф.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Гематологический научный центр» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ ГНЦ Минздрава России)

Карякин Александр Вадимович – заведующий лабораторией экспертизы, контроля и изучения качества, эффективности, безопасности препаратов крови, кровезаменителей и консервирующих растворов, д. биол. н., проф.

Скоцеляс Елена Дмитриевна – заведующая лабораторией, к.биол.н.

Чарыкова Ольга Николаевна – инженер

Ермакова Людмила Николаевна – старший научный сотрудник, к.биол.н.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский медицинский научно-производственный центр «Росплазма» Федерального медико-биологического агентства России» (ФГБУ РМНПЦ «Росплазма» ФМБА России)

Лиманская Елена Петровна – начальник отдела контроля качества

Областное бюджетное учреждение здравоохранения «Ивановская областная станция переливания крови»

Тюриков Юрий Михайлович – директор, действующий член Академии медико-технических наук (АМТН), Отличник здравоохранения, к.мед.н., врач высшей категории

Государственное учреждение здравоохранения «Липецкая областная станция переливания крови»

Удалова Лариса Вячеславовна – заведующая отделом управления качеством, врач клинико-лабораторной диагностики первой квалификационной категории

Федеральное государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Центр крови» Федерального медико-биологического агентства России

Эйхлер Ольга Валерьевна – заместитель начальника Управления здравоохранения Федерального медико-биологического агентства

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт имени В.В. Закусова» Российской академии медицинских наук (ФГБУ «НИИ им. В.В. Закусова» РАМН)

Пятин Борис Михайлович – д.фарм.н., проф.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр Российской Федерации - Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна» (ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России)

Кодина Галина Евгеньевна – заведующая отделом радиационных технологий медицинского назначения, заведующая лабораторией технологий и методов контроля радиофармпрепаратов, к.хим.н.

Кузнецов Михаил Анатольевич – инженер Отдела радиационных технологий медицинского назначения

Открытое акционерное общество «Центр по химии лекарственных средств - Всероссийский научно-исследовательский химико-фармацевтический институт» (ОАО «ЦХЛС-ВНИХФИ»)

Дегтерев Евгений Викторович – заведующий аналитическим отделом, д.фарм.н.

Деханова Ольга Алексеевна – заведующая лабораторией анализа готовых лекарственных средств, к.фарм.н.

Волосатова Ирина Сергеевна – заведующая лабораторией технологии готовых лекарственных средств

Чистяков Виктор Владимирович – д.фарм.н.

ОАО «Всероссийский научный центр по безопасности биологически активных веществ» (ОАО «ВНЦ БАВ»)

Скачилова София Яковлевна – заведующая отделом химии и технологии, д.хим.н., проф.

Березовская Ирина Владимировна – руководитель отдела лекарственной безопасности, д.мед.н., проф.

ОАО «Научно-исследовательский институт витаминов» (ОАО «НИИ витаминов»)

Львова Мария Шалвовна – заведующая сектором НИИ витаминов, к.хим.н.

ЗАО «Московская фармацевтическая фабрика»

Воронова Татьяна Николаевна – заместитель генерального директора по качеству

ООО «Технология лекарств»

Гойзман Михаил Самуилович – директор по науке, к.хим.н.

Ассоциация производителей фармацевтической продукции и изделий медицинского назначения

Руденко Олег Сергеевич – исполнительный директор

Дараган Надежда Константиновна – заместитель исполнительного директора

Некоммерческая организация «Профессиональная ассоциация натуротерапевтов» (НО ПАНТ)

Киселева Татьяна Леонидовна – Президент Ассоциации и председатель научного общества профессиональной ассоциации натуротерапевтов, д.фарм.н., проф.

Чаузова Александра Викторовна – к.фарм.н.

Некоммерческое партнёрство содействия здравоохранению «Научный центр контроля качества»

Гуськова Татьяна Анатольевна – руководитель отдела оценки эффективности и безопасности лекарственных средств, член Совета по этике МЗ РФ, член-корр. РАМН, д.мед.н., проф.

ООО «Протеиновый контур» (ООО ПК)

Коробицын Леонид Павлович – руководитель отдела клеточных культур, к.биол.н.

ОАО «Новосибхимфарм»

Багирова Валерия Леонидовна – директор по науке и развитию, д.ф.н., проф.

ОАО «Красногорсклексредства»

Семионова Марина Владимировна – заместитель руководителя департамента развития и науки

Стуловский Сергей Сергеевич – заместитель начальника отдела стандартизации и развития, к.фарм.н.

Трифонова Ольга Брониславовна – директор по качеству и развитию

Лапкина Ольга Юрьевна – начальник отдела обеспечения качества

Стряпушкин Павел Алексеевич – начальник отдела стандартизации и развития

Суханова Лариса Васильевна – руководитель департамента развития и науки

Коваль Инна Александровна – инженер-лаборант отдела стандартизации и развития

ООО «Гомеофарм»

Гаккель Василий Андреевич – заместитель генерального директора, к. фарм.н.

ОАО «Валента Фарм»

Петров Николай Витальевич – руководитель исследовательского центра, к.фарм.н.

ЗАО «Самаралектравы»

Лужнов Николай Данилович **–** генеральный директор

2. Организации, учреждения России и специалисты, принявшие участие в обсуждении и рецензировании проектов общих фармакопейных статей и фармакопейных статей Государственной фармакопеи Российской Федерации XIV издания

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НЦЭСМП» МЗ РФ)

Ковалева Елена Леонардовна – заместитель директора центра экспертизы и контроля готовых лекарственных средств, д.фарм.н.

Митькина Лидия Ивановна **–** начальник управления экспертизы лекарственных средств № 4 центра экспертизы и контроля готовых лекарственных средств, д.фарм.н.

Николаева Ольга Борисовна - заместитель начальника управления экспертизы лекарственных средств № 4 центра экспертизы и контроля готовых лекарственных средств, к.фарм.н.

Нечаева Екатерина Борисовна – заместитель начальника испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств, к.фарм.н.

Боковикова Татьяна Николаевна **–** начальник лаборатории химико-фармацевтических препаратов № 1 испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств, д.фарм.н.

Герникова Евгения Петровна **–** главный эксперт лаборатории химико-фармацевтических препаратов № 1 испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств, к.фарм.н.

Милкина Светлана Евгеньевна **–** главный эксперт лаборатории химико-фармацевтических препаратов № 2 испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств

Швец Сергей Витальевич **–** главный эксперт лаборатории биотехнологических препаратов испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств, к.хим.н.

Шкарина Татьяна Николаевна **–** ведущий эксперт лаборатории биотехнологических препаратов испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств, к.фарм.н.

Середенко Вера Ивановна **–** начальник лаборатории витаминов, гормонов и синтетических аналогов испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств, к.хим.н.

Гунар Ольга Викторовна **–** начальник лаборатории микробиологии испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств, д.фарм.н.

Кулешова Светлана Ивановна **-–** начальник лаборатории антибиотиков испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств, к.фарм.н

Триус Нина Викторовна – начальник лаборатории испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств

Сумцов Михаил Александрович **–** начальник сектора испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств, к. фарм.н.

Батурина Ольга Анатольевна **–** главный эксперт лаборатории химико-фармацевтических препаратов № 1 испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств

Пурим Юлия Борисовна **–** ведущий эксперт лаборатории химико-фармацевтических препаратов № 1 испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств

Агапкина Маргарита Васильевна **–** эксперт 1 категории лаборатории химико-фармацевтических препаратов № 1 испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств

Гадасина Наталья Вячеславовна **–** эксперт 1 категории лаборатории химико-фармацевтических препаратов № 1 испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств

Буланова Людмила Николаевна **–** эксперт 1 категории лаборатории химико-фармацевтических препаратов № 1 испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств

Чайковская Екатерина Валерьевна **–** эксперт 1 категории лаборатории химико-фармацевтических препаратов № 1 испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств

Немыкина Светлана Анатольевна **–** эксперт 1 категории лаборатории химико-фармацевтических препаратов № 1 испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств

Орлов Дмитрий Александрович **–** главный эксперт лаборатории биотехнологических препаратов испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств

Кириченко Елена Владимировна **–** эксперт 1 категории лаборатории биотехнологических препаратов испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств

Мамашина Ермония Арутюновна **–** главный эксперт контрольно-координационной лаборатории испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств, к.фарм.н.

Устинникова Ольга Борисовна **–** начальник лаборатории биохимии медицинских иммунобиологических препаратов испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов, к.биол.н.

Волкова Рауза Асхатовна **–** начальник лаборатории молекулярно-биологических и генетических методов испытаний испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов, д.биол.н.

Неугодова Наталья Петровна **–** начальник лаборатории фармакологии испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов, к.биол.н.

Мовсесянц Арташес Авакович **–** Начальник испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов, д.мед.н., проф.

Величко Елена Викторовна **–** главный технолог испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов, к.хим.н.

Медуницын Николай Васильевич **–** главный научный сотрудник отдела научно-методического обеспечения экспертизы лекарственных средств и медицинских иммунобиологических препаратов испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов, д.мед.н., проф., акад. РАН

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ГБОУ ВПО «Первый МГМУ» им. И.М. Сеченова Минздрава России)

Пятигорская Наталья Валерьевна **–** заместитель директора по научной работе Научно-исследовательского института фармации, заведующая учебной частью кафедры промышленной фармации, к.фарм.н., проф.

Самылина Ирина Александровна **–** профессор кафедры фармацевтического естествознания, член-корр. РАН, д.фарм.н., проф.

Дементьева Наталья Николаевна **–** профессор Научно-исследовательского института фармации, д.фарм.н., академик МАИ

Завражная Тамара Александровна – ведущий научный сотрудник лаборатории анализа и технологии Научно-исследовательского института фармации, к.фарм.н.

Рудакова Инна Павловна – главный научный сотрудник лаборатории фармакокинетики, профессор кафедры организации производства и реализации лекарственных средств фармацевтического факультета, д.хим.н.

Астраханова Маргарита Михайловна **–** главный научный сотрудник лаборатории фармакогнозии Научно-исследовательского института фармации, академик МАИ, д.фарм.н., проф.

Стреляева Ангелина Вадимовна – ведущий научный сотрудник лаборатории фармакогнозии Научно-исследовательского института фармации, профессор кафедры фармакогнозии, д.фарм.н., доцент

Ковалева Татьяна Юрьевна – старший преподаватель кафедры фармакогнозии Научно-исследовательского института фармации, к.фарм.н.

Терёшкина Ольга Ивановна – заведующая лабораторией анализа и технологии Научно-исследовательского института фармации, к.фарм.н.

Ермакова Валентина Алексеевна – профессор кафедры фармацевтического естествознания, д.фарм.н. проф.

Аксенова Валентина Александровна **–** заведующая отделом туберкулеза у детей и подростков Научно-исследовательского института фтизиопульмонологии, главный внештатный специалист детский фтизиатр МЗ РФ, д.мед.н., проф.

Краснюк Иван Иванович **–** декан фармацевтического факультета, заведующий кафедрой фармацевтической технологии, д. фарм. н., проф.

Раменская Галина Владиславовна – заведующая кафедрой фармацевтической и токсикологической химии фармацевтического факультета им. А.П. Арзамасцева, д.фарм. н., проф.

Садчикова Наталья Петровна – профессор кафедры фармацевтической и токсикологической химии фармацевтического факультета им. А.П. Арзамасцева, д.фарм.н.

Самылина Ирина Александровна – профессор кафедры фармакогнозии фармацевтического естествознания, член-корр. РАН, д.фарм.н., проф.

Рудакова Инна Павловна – профессор кафедры организации производства и реализации лекарственных средств фармацевтического факультета, д.хим.н.

Скатков Сергей Александрович – завуч кафедры фармацевтической технологии фармацевтического факультета, доцент, к.фарм.н.

Демина Наталья Борисовна – профессор кафедры фармацевтической технологии фармацевтического факультета, д.фарм.н.

Матюшина Галина Павловна – профессор кафедры технологии лекарственных форм фармацевтического факультета, д.фарм.н.

Михайлова Галина Владимировна – доцент кафедры технологии лекарственных форм фармацевтического факультета, заместитель декана фармацевтического факультета, заслуженный работник высшей школы, к.фарм.н.

Прокофьева Вера Ивановна – профессор кафедры фармацевтической и токсикологической химии фармацевтического факультета, д.фарм.н.

Андрианова Ольга Павловна – доцент кафедры фармацевтической и токсикологической химии фармацевтического факультета, к.фарм.н.

Рыженкова Александра Петровна – доцент кафедры фармацевтической и токсикологической химии фармацевтического факультета, к.фарм.н.

Чумакова Зинаида Васильевна – доцент кафедры фармацевтической и токсикологической химии фармацевтического факультета, к.фарм.н.

Щепочкина Ольга Юрьевна – доцент кафедры фармацевтической и токсикологической химии фармацевтического факультета им. А.П. Арзамасцева, к.фарм.н.

Кувырченкова Ирина Сергеевна **–** доцент кафедры фармацевтической и токсикологической химии фармацевтического факультета, д.фарм.н.

Калмыкова Татьяна Петровна **–** доцент кафедры фармацевтической технологии, к.биол.н.

Денисова Татьяна Викторовна – доцент кафедры фармацевтической технологии фармацевтического факультета, к.фарм.н.

Скляренко Валентина Ивановна – доцент фармацевтической технологии фармацевтического факультета, к.фарм.н.

Король Людмила Анатольевна – доцент фармацевтической технологии фармацевтического факультета, к.фарм.н.

Бардаков Александр Иванович – доцент фармацевтической технологии фармацевтического факультета, к.фарм.н.

Литвин Александр Алексеевич – профессор кафедры фармацевтической и токсикологической химии фармацевтического факультета, д.биол.н.

Буданова Елена Вячеславовна – заведующая учебной частью медико-профилактического факультета, доцент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии, к.мед.н.

Шандала Михаил Георгиевич – профессор кафедры дезинфектологии Института профессионального образования, д.мед.н., академик РАМН

Аладышева Жанна Игоревна – доцент кафедры промышленной фармации Института профессионального образования, к.мед.н.

Печенников Валерий Михайлович – доцент кафедры фармации Института профессионального образования, к.фарм.н.

Власов Александр Михайлович – доцент кафедры фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева, к.фарм.н.

Родионова Галина Михайловна – доцент кафедры фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева, к.фарм.н.

Смирнов Валерий Валерьевич – доцент кафедры фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева, к.фарм.н.

Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ПМФИ - филиал ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России)

Аджиенко Всеволод Леонидович – директор ПМФИ, д.мед.н., проф.

Коновалов Дмитрий Алексеевич – заместитель директора ПМФИ по научной работе, заведующий кафедрой фармакогнозии, д.фарм.н., проф.

Попова Ольга Ивановна – профессор кафедры фармакогнозии, д.фарм.н.

Денисенко Олег Николаевич – заведующий кафедрой фармации факультета последипломного образования, д. фарм.н., проф.

Степанова Элеонора Федоровна – профессор кафедры технологии лекарств, д.фарм.н.

Верниковский Владислав Владиславович – доцент кафедры технологии лекарств, к.биол.н.

Шамилов Арнольд Алексеевич – старший преподаватель кафедры фармакогнозии, к.фарм. н.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный

медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России)

Кудашкина Наталья Владимировна **–** заведующий кафедрой фармакогнозии с курсом ботаники и основ фитотерапии, д.фарм.н., проф.

Пупыкина Кира Александровна **–** профессор кафедры фармакогнозии с курсом ботаники и основ фитотерапии, д.фарм.н., проф.

Хасанова Светлана Рашитовна **–** профессор кафедры фармакогнозии с курсом ботаники и основ фитотерапии, д.фарм.н., доцент

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России)

Орлова Екатерина Владимировна **–** и.о. ректора, заведующая кафедрой технологии, к.фарм.н., доцент

Олешко Григорий Иванович – проректор по организационной работе, профессор кафедры фармакогнозии с курсом ботаники

Одегова Татьяна Федоровна – заведующая кафедрой микробиологии, д.фарм.н., проф.

Алексеева Ирина Владимировна – профессор кафедры фармацевтической технологии, д.фарм.н.

Пулина Наталья Алексеевна **–** заведующая кафедрой фармацевтической технологии, д.фарм.н., проф.

Донцова Людмила Петровна – ассистент кафедры фармацевтической технологии, к.фарм.н.

Шрамм Наталья Ивановна **–** доцент кафедры фармацевтической технологии, к.фарм.н.

Смирнов Марина Мироновна **–** доцент кафедры фармацевтической технологии, к.фарм.н.

Вихарева Елена Владимировна – заведующая кафедрой аналитической химии, д.фарм.н., проф.

Бабиян Лариса Константиновна – доцент кафедры фармацевтической технологии, к.фарм.н.

Липатникова Ирина Аркадьевна - доцент кафедры фармацевтической технологии, к.фарм.н.

Рюмина Татьяна Евгеньевна – доцент кафедры общей и органической химии, к.хим.н.

Хомов Юрий Александрович – профессор кафедры фармацевтической химии ФДПО и факультета заочного обучения, декан факультета подготовки иностранных граждан, д.фарм.н.

Кремлева Ольга Борисовна – старший преподаватель кафедры общей и органической химии, к.хим.н.

Решетников Виктор Иванович **–** профессор кафедры промышленной технологии лекарств, д.фарм.н.

Молохова Елена Игоревна – профессор кафедры промышленной технологии, д.фарм.н.

Рязанов Владимир Николаевич **–** доцент кафедры промышленной технологии, к.фарм.н.

Петухова Татьяна Владимировна **–** старший преподаватель кафедры промышленной технологии лекарств, к.фарм.н.

Белоногова Валентина Дмитриевна – заведующая кафедрой фармакогнозии с курсом ботаники, д.фарм.н., профессор

Корепанова Наталья Степановна – доцент кафедры фармакогнозии с курсом ботаники, к.фарм.н.

Головаченко Анна Леонидовна – доцент кафедры фармацевтической технологии, к.фарм.н.

Печерская Людмила Григорьевна – доцент кафедры фармакогнозии с курсом ботаники, к.фарм.н.

Блинова Ольга Леонидовна **–** старший преподаватель кафедры фармакогнозии с курсом ботаники, к.фарм.н.

Иванова Галина Анатольевна **–** старший преподаватель кафедры фармакогнозии с курсом ботаники, к.фарм.н.

Галишевская Елена Евгеньевна **–** доцент кафедры фармакогнозии с курсом ботаники, к.фарм.н.

Левинова Вера Федоровна **–** доцент кафедры фармакогнозии с курсом ботаники, к. фарм.н.

Малкова Тамара Леонидовна **–** заведующая кафедрой токсикологической химии, д.фарм.н., доцент

Турышев Алексей Юрьевич **–** доцент кафедры фармакогнозии с курсом ботаники, декан факультета заочного обучения, к.фарм.н.

Решетникова Мария Дмитриевна **–** доцент кафедры фармакогнозии с курсом ботаники, к.фарм.н.

Седова Алевтина Борисовна **–** доцент кафедры фармакогнозии с курсом ботаники, к.фарм.н.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова» (МГУ имени М.В.Ломоносова)

Егоров Сергей Николаевич **–** доцент кафедры молекулярной биологии биологического факультета, д.биол.н.

Орлова Марина Алексеевна **–** ведущий научный сотрудник кафедры химического факультета, заведующая лабораторией биохимии и энзимологии ФНКЦ ДГОИ им. Д.Рогачева**,** д.хим.н.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский

государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России (Ф*ГБОУ ВО СПХФУ*)

Наркевич Игорь Анатольевич **–** ректор, д.фарм.н., проф.

Яковлев Геннадий Павлович **–** профессор кафедры фармакогнозии, д.биол.н.

Алексеева Галина Михайловна – заведующая кафедрой аналитической химии, к.хим.н., доцент

Яковлев Константин Иванович **–** доцент кафедры аналитической химии, к.хим.н.

Стрелова Ольга Юрьевна – заведующая кафедрой фармацевтической химии, к.хим.н., доцент

Блинова Мария Петровна **–** старший преподаватель кафедры фармацевтической химии

Криштанова Надежда Александровна **–** доцент кафедры фармацевтической химии, к.фарм.н.

Марченко Алексей Леонидович **–** доцент кафедры промышленной технологии лекарственных препаратов, к.фарм.н.

Вайнштейн Виктор Абрамович **–** профессор кафедры промышленной технологии лекарственных препаратов, д.фарм.н.

Скляревская Нелли Владимировна **–** доцент кафедры фармакогнозии, к.фарм.н.

Мистрова Анастасия Алексеевна **–** старший преподаватель кафедры фармакогнозии, к.фарм.н.

Повыдыш Мария Николаевна **–** доцент кафедры фармакогнозии, д.биол.н**.**

Фомина Людмила Ивановна **–** доцент кафедры фармакогнозии, к.биол.н**.**

Белодубровская Галина Александровна **–** доцент кафедры фармакогнозии, к.фарм.н.

Гончаров Михаил Юрьевич – доцент кафедры фармакогнозии, к.фарм.н.

Пряхина Нина Ивановна – доцент кафедры фармакогнозии, к.фарм.н.

Дудецкая Наталья Александровна – старший преподаватель кафедры фармакогнозии, к.фарм.н.

Ефимова Ксения Николаевна – старший преподаватель кафедры фармакогнозии, к.фарм.н.

Жохова Елена Владимировна – доцент кафедры фармакогнозии, к.фарм.н.

Харитонова Нина Петровна – доцент кафедры фармакогнозии, к.фарм.н.

Клемпер Алексей Владимирович – доцент кафедры фармакогнозии, к.фарм.н.

Лужанин Владимир Геннадьевич – и.о. заведующего кафедрой фармакогнозии, к.биол.н.

Теслов Леонид Степанович – доцент кафедры фармакогнозии, к.фарм.н.

Бабушкина Евгения Викторовна – старший преподаватель кафедры фармакогнозии

Котова Надежда Ивановна – доцент кафедры фармацевтической химии, к.фарм.н.

Яковлев Игорь Павлович – заведующий кафедрой органической химии, д.хим.н., проф.

Каухова Ирина Евгеньевна – заведующая кафедрой промышленной технологии лекарственных препаратов, д.фарм.н., проф.

Громова Лидия Ивановна – к.хим.н.

Басевич Анна Викторовна – доцент кафедры промышленной технологии лекарственных препаратов, к.фарм.н.

Ананьева Елена Павловна – заведующая кафедрой микробиологии, к.биол.н., доцент

Гурина Светлана Владимировна **–** доцент кафедры микробиологии, к.биол.н.

Спасенкова Ольга Михайловна **–** доцент кафедры биохимии, к.мед.н.

Кириллова Надежда Васильевна **–** заведующая кафедрой биохимии, д.биол.н., проф.

Венникас Ольга Ричардовна – доцент кафедры биохимии, к.биол.н.

Тихомирова Ольга Михайловна **–** доцент кафедры микробиологии, к.биол.н.

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов» (ФГАОУ ВО РУДН)

Филиппов Владимир Михайлович **–** ректор РУДН, д.физ.-мат.н., проф., академик Российской академии образования

Плетнева Татьяна Вадимовна **–** заведующая кафедрой фармацевтической и токсикологической химии, д.хим.н., проф.

Попов Павел Игоревич **–** ассистент кафедры фармацевтической и токсикологической химии, провизор-аналитик, к.биол.н.

Абрамович Римма Александровна **–** директор Центра коллективного пользования (Научно-образовательного центра), д.фарм.н., доцент

Потанина Ольга Георгиевна **–** директор центра научных исследований и разработок Центра коллективного пользования (Научно-образовательного центра), д.фарм.н.

Емшанова Светлана Витальевна **–** начальник отдела научных разработок Центра коллективного пользования (Научно-образовательного центра), д.фарм.н.

Васильева Елена Александровна **–** доцент кафедры микробиологии и вирусологии, к.мед.н.

Аллилуев Александр Павлович **–** старший научный сотрудник, заведующий лабораторией кафедры общей патологии и патологической физиологии, к.мед.н.

Горяинов Сергей Владимирович **–** заведующий лабораторией масс-спектрометрии высокого разрешения и спектроскопии ЯМР Центра презиционных инструментальных методов анализа «Прима» (ЦКП (НОЦ) РУДН

Никулин Александр Владимирович **–** заведующий лабораторией физико-химических методов исследования Испытательного центра Центра контроля качества лекарственных средств ЦКП (НОЦ) РУДН, к.хим.наук

Воробьев Александр Николаевич **–** заведующий лабораторией промышленной фармацевтической технологии Центра научных исследований и разработок ЦНИР ЦКП (НОЦ) РУДН, к.фарм.н.

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России)

Калинкина Галина Ильинична – заместитель декана по заочному отделению фармацевтического факультета, заведующая кафедрой фармакогнозии с курсами ботаники и экологии, д.фарм.н., проф.

Федько Ирина Валерьевна **–** заместитель декана по заочному отделению фармацевтического факультета, старший преподаватель кафедры фармакогнозии с курсами ботаники и экологии, к.фарм.н.

Коломиец Наталья Эдуардовна **–** профессор кафедры фармакогнозии с курсами ботаники и экологии, д.фарм.н.

Андреева Валерия Юрьевна **–** доцент кафедры фармакогнозии с курсами ботаники и экологии, к.биол.н.

Исайкина Надежда Валентиновна **–** старший преподаватель кафедры фармакогнозии с курсами ботаники и экологии, к.фарм.н.

Чучалин Владимир Сергеевич – заведующий кафедрой фармацевтической технологии, д.фарм.н., проф.

Новицкий Вячеслав Викторович **–** заведующий кафедрой патофизиологии, д.мед.н., проф., академик РАМН

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ГБОУ ВПО СамГМУ Минздрава России)

Куркин Владимир Александрович **–** заведующий кафедрой фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии, д.фарм.н., проф.

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (НИУ «БелГУ»)

Покровский Михаил Владимирович – заведующий кафедрой фармакологии и фармацевтических дисциплин факультета последипломного медицинского образования, д.мед.н., проф.

Новиков Олег Олегович **–** заведующий кафедрой фармацевтической химии и фармакогнозии, д.фарм.н., проф.

Писарев Дмитрий Иванович **–** доцент кафедры фармацевтической химии и фармакогнозии, д.фарм.н.

Автина Татьяна Валерьевна – ассистент кафедры фармакологии и фармацевтических дисциплин факультета последипломного медицинского образования

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России)

Дармограй Василий Николаевич – заведующий кафедрой фармакогнозии с курсом ботаники, д.фарм.н., проф., заслуженный работник высшей школы Российской Федерации

Морозова Валентина Анатольевна – ассистент кафедры фармакогнозии с курсом ботаники

Боровикова Наталья Анатольевна – ассистент кафедры фармацевтической технологии, к.фарм.н.

ОАО «Всероссийский научный центр по безопасности биологически активных веществ» (ВНЦ БАВ)

Ермакова Галина Александровна – ведущий научный сотрудник отдела химии и технологии синтетических лекарственных средств, к.биол.н.

Ермакова Валентина Константиновна – ведущий научный сотрудник отдела аналитических исследований, к.хим.н.

Жестков Владимир Павлович – заведующий аналитическим отделом, к.хим.н.

Шароварникова Лариса Алексеевна – заведующая сектором синтеза

Березовская Ирина Владимировна – руководитель отдела лекарственной безопасности, д.мед.н., проф.

Тропина Валентина Ивановна **–** заведующая лабораторией аналитического и микробиологического контроля, к.биол.н.

Федеральное унитарное государственное предприятие «Государственный научный центр по антибиотикам» (ГНЦА)

Долгова Галина Владимировна – руководитель сектора фармакологии, к.биол.н.

Государственное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений» Российской академии сельскохозяйственных наук (ГНУ ВИЛАР Россельхозакадемии)

Джавахян Марина Аркадьевна – ведущий научный сотрудник научно-организационного отдела к.фарм.н., доцент

Богачева Надежда Гавриловна – руководитель группы фармакогнозии стандартизации, к.фарм.н.

Баслинов Санджи Лиджиевич **–** младший научный сотрудник лаборатории аналитической химии

Шипулина Людмила Дмитриевна **–** ведущий научный сотрудник отдела экспериментальной и клинической фармакологии, руководитель группы химиотерапии, к.биол.н.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Российский онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина» (НИИ ЭДиТО ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н.Блохина» РАМН)

Шпрах Зоя Сергеевна **-** заместитель директора по общим вопросам и развитию, к.фарм.н.

Открытое акционерное общество «Центр по химии лекарственных средств - Всероссийский научно-исследовательский химико-фармацевтический институт» (ОАО «ЦХЛС-ВНИХФИ»)

Дегтерев Евгений Викторович – заведующий аналитическим отделом, д.фарм.н.

Чистяков Виктор Владимирович **–** д.фарм.н.

Кузовкин Владимир Алексеевич **–** ведущий научный сотрудник, к.хим.н.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Московский государственный университет тонких химических технологий имени М.В. Ломоносова» (МИТХТ им. М.В. Ломоносова)

Финкельштейн Евгений Иосифович - руководитель лаборатории контроля качества лекарственных средств "БИОЛЕК" при кафедре биотехнологии и бионанотехнологии, д.хим.н., проф.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр Российской Федерации - Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна» (ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России)

Котенко Константин Валентинович **–** генеральный директор, д.мед.н., проф.

Титов Алексей Викторович **–** старший научный сотрудник лаборатории радиационной коммунальной гигиены №14 отдела радиационной безопасности №3

Филонова Анна Александровна **–** младший научный сотрудник лаборатории радиационной коммунальной гигиены №14 отдела радиационной безопасности №3

Павлов Евгений Петрович **–** старший научный сотрудник лаборатории доклинических и клинических исследований радиофармпрепаратов №36 отдела радиационных технологий медицинского назначения №8, к.мед.н

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов» (ФГУП «ГосНИИгенетика»)

Тяглов Борис Владимирович **–** ведущий научный сотрудник, к.хим.н.

Международный учебно-научный лазерный центр МГУ им. М.В.Ломоносова (МЛЦ МГУ)

Макаров Владимир Анатольевич **–** директор МЛЦ МГУ, д.физ.-мат.н., проф.

Приезжаев Александр Васильевич **–** к.физ-мат.н., доцент

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биологии развития им. Н.К.Кольцова» Российской академии наук (ФГБУН ИБР им. Н.К. Кольцова РАН)

Шарова Наталия Петровна **–** заведующая лабораторией биохимии процессов онтогенеза, д.биол.н.

Михайлов Виктор Сергеевич **–** главный научный сотрудник лаборатории биохимии процессов онтогенеза, д.биол.н., проф.

Люпина Юлия Вячеславовна **–** старший научный сотрудник лаборатории биохимии процессов онтогенеза, к.биол.н.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук (ИБХ РАН)

Иванов Вадим Тихонович **–** директор ИБХ РАН, д.хим.н, проф., академик

Мирошников Анатолий Иванович **–** заместитель директора ИБХ РАН, д.хим.н., академик

Шибанова Елена Дмитриевна – руководитель контрольно-аналитической лаборатории, к.хим.н.

Патрушев Лев Иванович - ведущий научный сотрудник лаборатории биотехнологии, д.биол.н., проф.

Федеральное государственное унитарное предприятие «Московский эндокринный завод»

Руденко Вячеслав Федорович – главный инженер

Дунаева Марина Владимировна – начальник центральной заводской лаборатории

Федеральное государственное унитарное предприятие «Научно-производственное объединение по медицинским иммунобиологическим препаратам «Микроген» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России)

Руденко Вячеслав Федорович – первый заместитель генерального директора

Ершов Алексей Евгеньевич **–** начальник управления регистрации и медицинских исследований

Черничук Ольга Владимировна **–** исполнительный директор АО НПО «Микроген»

Волощук Ольга Максимовна – начальник отдела регистрации МИБП АО НПО «Микроген»

Алиева Зинфира Алислановна – главный специалист-эксперт отдела регистрации АО НПО «Микроген»

Назарова Татьяна Александровна – главный специалист отдела регистрации АО НПО «Микроген»

Качалова Ксения Александровна – главный специалист отдела регистрации АО НПО «Микроген»

Ночевная Татьяна Владимировна – главный специалист отдела регистрации АО НПО «Микроген»

Лодочникова Марина Александровна – главный специалист отдела регистрации АО НПО «Микроген»

Терехова Елена Александровна – главный специалист отдела регистрации АО НПО «Микроген»

Базылева Елена Петровна – начальник отдела регистрации готовых лекарственных средств АО НПО «Микроген»

Репина Ксения Николаевна – главный специалист-эксперт отдела регистрации готовых лекарственных средств АО НПО «Микроген»

Ломова Анжелика Николаевна – специалист системы менеджмента качества отдела обеспечения качества филиала АО НПО «Микроген» в г. Ставрополь «Аллерген»

Голубева Наталья Александровна – начальник отдела обеспечения качества АО НПО «Микроген» в г. Нижний Новгород «Нижегородское предприятие по производству бактерийных препаратов «ИмБио»

Ванькова Нина Алексеевна – заместитель начальника отдела контроля качества АО НПО «Микроген» в г. Пермь «Пермское НПО «Биомед»»

Золотарева Татьяна Геннадьевна – начальника отдела регистрации АО НПО «Микроген» в г. Томск «НПО «Вирион»

Нигматуллина Альфия Салихзяновна **–** начальника отдела регистрации и лицензирования АО НПО «Микроген» в г. Уфа «Иммунопрепарат»

Суханова Лидия Львовна **–** заместитель директора по качеству внутреннего структурного подразделения АО НПО «Микроген» «Московское подразделение по производству бактерийных препаратов»

Орлачева Марина Александровна **–** микробиолог внутреннего структурного подразделения АО НПО «Микроген» «Московское подразделение по производству бактерийных препаратов»

Тимонин Игорь Михайлович **–** начальник отдела контроля качества АО НПО «Микроген»

Санкт-Петербургское государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Северо-Западный центр по контролю качества лекарственных средств» (СПб ГБУЗ «СЗЦККЛС»)

Смирнова Ирина Геннадьевна – директор

Федеральное государственное унитарное предприятие «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» Федерального медико-биологического агентства (ФГУП «ГосНИИ ОЧБ» ФМБА России)

Таратина Татьяна Михайловна – ведущий научный сотрудник

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ГБОУ ВПО КГМУ Минздрава России)

Лазаренко Виктор Анатольевич **–** ректор, д.мед.н., проф.

Конопля Александр Иванович - проректор по учебной работе, д.мед.н., проф.

ПанкрушеваТатьяна Александровна **–** заведующая кафедрой фармацевтической технологии, д.фарм.н., проф.

Бубенчикова Валентина Николаевна – заведующая кафедрой фармакогнозии и ботаники, д.фарм. н., проф.

Дроздова Ирина Леонидовна **–** профессор кафедры фармакогнозии и ботаники, д.фарм.н.

Сухомлинов Юрий Анатольевич **–** доцент кафедры фармакогнозии и ботаники, к.фарм.н.

Кондратова Юлия Александровна **–** старший преподаватель кафедры фармакогнозии и ботаники, к.фарм.н.

Федеральное Государственное Бюджетное Научное Учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт мясной промышленности имени В.М. Горбатова (ФГБНУ "ВНИИМП им. В.М. Горбатова")

Люблинская Людмила Ароновна **–** ведущий научный сотрудник экспериментальной клиники – лаборатории биологически активных веществ животного происхождения, к.хим.н.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физической химии и электрохимии имени А. Н. Фрумкина РАН (ИФХЭ РАН им. А.Н. Фрумкина)

Ершов Борис Григорьевич **–** заместитель директора по научной работе, член-корр. РАН

Захарова Елена Васильевна **–** заведующая лабораторией экологических проблем обращения с радиоактивными и токсичными отходами, к.хим.н.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Иркутский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО ИГМУ Минздрава России)

Мирович Вера Михайловна – заведующая кафедры фармакогнозии и фармацевтической технологии., д.фарм.н., доцент

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени имени Г.Ф. Гаузе» Российской академии медицинских наук (ФГБУ НИИ по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе РАМН)

Фирсов Александр Алексеевич – директор института, член-корреспондент РАМН, д.биол.н., проф.

Трещалин Иван Дмитриевич **–** заведующий лабораторией фармакологии и химиотерапии, к.мед.н.

ООО Контрольно-аналитическая лаборатория «Фарманализ» (ООО «КоАЛ Фарманализ»)

Елизарова Татьяна Евгеньевна **–** генеральный директор, к.биол.н.

Молодова Татьяна Анатольевна – заведующая микробиологической лабораторией

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза» Российской академии медицинских наук (ФГБУ «ЦНИИТ» РАМН)

Овсянникова Елена Сергеевна **–** заведующая детско-подростковым отделом, д.мед.н., проф.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «ФНЦТИО им. ак. В.И.Шумакова» Минздрава России)

Горская Екатерина Михайловна **–** старший научный сотрудник отдела эндотоксикозов и гнойно-септических осложнений, д.мед.н.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Шумаев Константин Борисович **–** д.биол.н.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «СПб НИИФ» Минздрава России)

Довгалюк Ирина Федоровна **–** главный фтизиопедиатр-эксперт Северо-Западного Федерального округа, руководитель отделения детской фтизиатрии, д.мед.н., проф., врач высшей категории

ЗАО «Исследовательский Институт Химического Разнообразия»

Демин Петр Михайлович **–** заведующий лабораторией, к.хим.н.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова» Российской академии наук (ИОГен РАН)

Одинцова Татьяна Игоревна – заведующая лабораторией молекулярно-генетических основ иммунитета растений отдела генетики растений, д.биол.н.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» Российской академии медицинских наук (ФГБУ «НИИВС им. И.И.Мечникова» РАМН)

Михайлова Наталья Александровна **–** заместитель директора института по научной работе, д.мед.н., проф.

Нагиева Фирая Галиевна – заведующая лабораторией гибридных клеточных структур отдела вирусологии, д.мед.н.

Ленева Ирина Анатольевна **–** заведующая лабораторией экспериментальной вирусологии отдела вирусологии, д.биол.н.

Гервазиева Валентина Борисовна **–** заведующая отделом аллергологии, д.мед.н., проф.

Федеральное государственное унитарное предприятие «Предприятие по производству бактерийных и вирусных препаратов Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П.Чумакова» (ФГУП "ПИПВЭ им. М.П.Чумакова")

Грачев Виктор Павлович **–** главный научный сотрудник, д.биол.н., профессор

Синюгина Александра Александровна **–** начальник отдела контроля качества

Хапчаев Юсуф Хаджи-бекович **–** начальник отделения полиомиелитной вакцины, д.биол.н.

Малкин Андрей Евгеньевич **–** начальник управления качеством

Михайлов Михаил Иванович **–** д.мед.н., член-корр. РАМН, проф.

Федеральное бюджетное учреждение науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им.Г.Н.Габричевского» Роспотребнадзора (ФБУН «МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора)

Шендеров Борис Аркадьевич – главный научный сотрудник, д.мед.н., проф.

Амерханова Аделаида Михайловна **–** руководитель лаборатории биологии бифидобактерий, д.биол.н.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства (ФГБУ «ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России)

Ярилин Александр Александрович – заведующий отделом клеточной иммунологии, д.мед.н., проф.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Московский государственный университет пищевых производств» (ФГБОУ ВПО «МГУПП»)

Ганина Вера Ивановна – заведующая кафедрой «Технология молока и молочных продуктов», д.техн.н., проф.

Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»)

Нечаева Елена Августовна – заместитель генерального директора по научной и производственной работе, к.мед.н.

Богрянцева Марина Поликарповна – начальник ОБТК, к.мед.н.

Тропинина Валентина Ивановна – заведующая сектором микробиологического контроля, к.биол.н.

Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы «Станция переливания крови Департамента здравоохранения г. Москвы» (ГБУЗ СПК ДЗМ)

Русанов Валентин Михайлович – заместитель главного врача по производству, д.мед.н., проф.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» (ФГБНУ НИИОПП»)

Сабурина Ирина Николаевна – заведующая лабораторией клеточной биологии и патологии развития, д.биол.н.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф.Гамалеи» Российской академии медицинских наук (ФГБУ НИИЭМ им. Н.Ф.Гамалеи)

Белоусова Любовь Сергеевна – заместитель директора

Раковская Ирина Валентиновна – руководитель лаборатории микоплазм и Л-форм бактерий отдела медицинской микробиологии, д.биол.н.

Ананьина Юлия Васильевна – заместитель директора по научной работе, руководитель лаборатории лептоспирозов отдела природноочаговых инфекций, д.биол.н., проф., член-корреспондент РАМН

Мещерякова Ирина Сергеевна – руководитель лаборатории туляремии отдела природноочаговых инфекций, д.биол.н.

Горина Луиза Георгиевна – ведущий научный сотрудник лаборатории микоплазм и Л-форм бактерий отдела медицинской микробиологии, д.биол.н.

Дмитренко Ольга Александровна – ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярных основ патогенности отдела бактериальных инфекций

Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» (ФБУН ГНЦ ПМБ)

Храмов Михаил Владимирович – заместитель директора по качеству и развитию, к.мед.н.

Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Иркутский ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФКУЗ Иркутский научно - исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора)

Андреевская Нина Михайловна – старший научный сотрудник, к.биол.н.

Гефан Наталья Геннадьевна – заведующая отделом биологического и технологического контроля, к.мед.н.

Каретникова Эльвира Семеновна – старший научный сотрудник научно-производственного отдела, к.мед.н.

Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора)

Никифоров Алексей Константинович **–** заместитель директора по экспериментально-производственной работе, к.мед.н.

Щуковская Татьяна Николаевна **–** заведующая отделом иммунологии, д.мед.н., проф.

Абрамова Елена Геннадьевна **–** заведующая лабораторией профилактических иммуноглобулинов, к.биол.н.

Лобовикова Оксана Анатольевна **–** заведующая отделом биологического и технологического контроля

Федеральное государственное бюджетное учреждение «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации

Борисевич Сергей Владимирович **–** начальник научно-исследовательского института, д.биол.н.

Мельников Денис Геннадьевич **–** начальник оспенного подразделения научно-исследовательского института, к.мед.н.

Краснянский Владимир Павлович **–** заведующий лабораторией научно-исследовательского института, д.мед.н., проф.

Охапкина Вероника Юрьевна **–** доцент, старший научный сотрудник

Миронин Александр Викторович – ведущий научный сотрудник

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт гриппа» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ НИИ гриппа МЗ РФ)

Цыбалова Людмила Марковна – заместитель директора по научной работе, руководитель отдела эпидемиологии и профилактики, д.мед.н.

Ерофеева Мариана Константиновна – заведующая лабораторией испытаний новых средств защиты от вирусных инфекций отдела эпидемиологии и профилактики, д.мед.н.

Никоноров Игорь Юрьевич – старший научный сотрудник лаборатории испытаний новых средств защиты от вирусных инфекций отдела эпидемиологии и профилактики

Ассоциация международных фармакопейных производителей (AIPM)

Юлова Татьяна Валерьевна – менеджер по регистрации

Взорова Людмила Николаевна – менеджер по регистрации, к.фарм.н.

ООО «Ферон»

Варданян Нина Васильевна – начальник отдела разработки новых лекарственных средств

ООО «Протеиновый контур» (ООО ПК)

Пивоваров Анатолий Михайлович – начальник химико-аналитического отдела, к.хим.н.

Антропова Галина Федоровна – руководитель аналитической группы

ЗАО «Биннофарм»

Николаев Тарас Маркович – директор по новым биотехнологическим проектам

ООО «Герофарм»

Родионов Петр Петрович – генеральный директор

Максумова Лола Даврановна – заместитель генерального директора по стратегическому развитию, к.мед.н.

Открытое акционерное общество «Химико-фармацевтический комбинат «Акрихин» (ОАО «Акрихин»)

Юрченко Николай Иванович – заместитель технического директора по развитию производства, к.хим.н.

Эпштейн Наум Аронович – *н*ачальник сектора физико-химических методов анализа, к.хим.н.

Михальченко Маргарита Евгеньевна – ведущий специалист центра контроля качества

ЗАО «Фарм-холдинг»

Васильева Любовь Александровна – заведующая испытательной аналитической лабораторией

ООО Фирма «Здоровье»

Шабанова Любовь Ивановна – генеральный директор

Смирнова Марина Александровна – заместитель генерального директора по качеству

Белоус Татьяна Александровна – начальник отдела контроля качества

Некоммерческое партнерство содействия развитию аптечной отрасли «Аптечная гильдия»

Неволина Елена Викторовна – исполнительный директор

ЗАО «Эвалар»

Сафонов Александр Владимирович – директор

Бондарчук Ольга Юрьевна – начальник отдела регистрации

ООО «Лек С+»

Пучков Валерий Николаевич – заместитель генерального директора по качеству

ОАО «Мосхимфармпрепараты» имени Н.А.Семашко

Иванов Сергей Викторович – генеральный директор

ОАО «Красногорсклексредства»

Трифонова Ольга Брониславовна – директор по качеству и развитию

Стряпушкин Павел Алексеевич – начальник отдела стандартизации и развития

Суханова Лариса Васильевна – руководитель департамента развития и науки

Лапкина Ольга Юрьевна – начальник отдела обеспечения качества

Стуловский Сергей Сергеевич – заместитель начальника отдела стандартизации и развития, к.фарм.н.

Сухих Жанна Шамильевна – заведующая химической лабораторией отдела контроля качества

Бессарабова Ольга Ивановна – начальник отдела контроля качества

Балаева Ирина Ивановна – заместитель начальника отдела контроля качества стандартизации и развития, д.фарм.н., доцент

Черданцев Андрей Владимирович – начальник службы закупки сырья

ЗАО «Ст.-Медифарм»

Смирнов Юрий Николаевич – генеральный директор

Смирнов Владимир Юрьевич - директор по развитию

ОАО «СИНТЕЗ»

Петухов Валерий Иванович – заместитель исполнительного директора

ООО «ФОРТ»

Игнатьев Георгий Михайлович – заместитель генерального директора, д.мед.н., проф.

Правила пользования	**ОФС.1.1.0001.18**
фармакопейными статьями	**Взамен ОФС.1.1.0001.15**

Настоящая общая фармакопейная статья определяет правила применения приводимых ниже терминов и понятий, используемых в общих фармакопейных статьях, фармакопейных статьях и приложениях.

Порядок использования текстов общих фармакопейных статей и фармакопейных статей Государственной фармакопеи Российской Федерации

При использовании материалов Государственной фармакопеи Российской Федерации, представленных в общих фармакопейных статьях, фармакопейных статьях и приложениях, следует приводить ссылки на эти статьи и приложения.

В случае использования при оценке качества лекарственных средств методов и методик, перечней показателей качества и их нормативных требований, отличающихся от приведенных в общих фармакопейных статьях, фармакопейных статьях Государственной фармакопеи Российской Федерации, это отличие должно быть обосновано соответствующим образом.

Вакуум. Термин «вакуум» означает, что давление не превышает 20 мм рт. ст. (2,66 кПа), если нет других указаний. Для высушивания в вакууме используют вакуумный сушильный шкаф, вакуумный пистолет или другие подобные приборы.

Время. Понятия *«сразу», «тотчас», «немедленно»* означают отрезок времени не более 30 с.

Понятие *«свежеприготовленный раствор»* означает раствор, приготовленный не более чем за 8 ч до его применения, если нет других указаний.

Вкус. Характеристика вкуса фармацевтических субстанций различного происхождения и лекарственных препаратов, в т.ч. водных извлечений из лекарственных растительных препаратов, приводится при необходимости и носит информационный характер.

Запах. Если запах не охарактеризован, то подразумевается его отсутствие у анализируемого лекарственного средства.

Цвет лекарственного средства следует характеризовать названиями: белый, синий, зеленый, желтый, оранжевый, красный и т.п. При оттеночных цветах на первом месте

указывают тот цвет, который содержится в меньшей доле, а затем через дефис – преобладающий цвет (например, красно-коричневый).

Слабоокрашенные образцы имеют оттенок цвета, название которого характеризуют суффиксом «-оват» (например, «желтоватый») или добавляют приставку «светло-» (например, «светло-желтый»).

Цвет твердых веществ следует определять на матово-белом фоне (белая плотная или фильтровальная бумага) при рассеянном дневном свете в условиях минимального проявления тени. Небольшое количество вещества (0,5 – 2,0 г) помещают на белую бумагу и без нажима равномерно распределяют по поверхности бумаги (осторожно разравнивают шпателем или другим приспособлением) так, чтобы поверхность оставалась плоской.

Гигроскопичность. Характеристика гигроскопичности фармацевтической субстанции и лекарственного препарата при необходимости приводится в разделе «Описание» и носит информационный характер.

Защищенное от света место. Если указано, что испытание проводят «в защищенном от света месте», то это означает, что следует принять меры во избежание попадания прямого солнечного света, любого другого яркого света, а также ультрафиолетовых лучей, например, путем использования посуды из специального стекла, работы в затемненной комнате и т.д.

Капля. Понятие «капля» означает объем от 20 до 50 мкл в зависимости от растворителя (см. Приложение); для водных растворов объем капли, отмериваемый стандартным каплемером, равен 50 мкл (в 1 мл содержится 20 капель).

Контрольный опыт. Под контрольным опытом подразумевают определение, проводимое с теми же количествами реактивов и в тех же условиях, но без испытуемого лекарственного средства, если нет других указаний в фармакопейной статье.

Кристалличность. Твердые субстанции могут быть крупнокристаллическими, кристаллическими, мелкокристаллическими или аморфными.

Крупнокристаллический порошок. Не более 40 % частиц порошка должно быть размером менее 0,4 мм.

Кристаллический порошок. Не менее 95 % частиц порошка должно быть размером менее 0,4 мм и не более 40 % – размером менее 0,2 мм.

Мелкокристаллический порошок. Не менее 95 % частиц порошка должно быть размером менее 0,2 мм.

Аморфный порошок – это порошок, не имеющий признаков кристаллического строения.

Некоторым твёрдым субстанциям свойственно явление *полиморфизма* – способность существовать в различных кристаллических формах при одинаковом химическом составе (ОФС «Полиморфизм»).

Характеристики кристалличности, полиморфизма и гигроскопичности в описании приводятся для информации и испытанию не подлежат. При необходимости нормирования величины частиц в нормативной документации приводят специальный раздел.

Методы испытаний. Как правило, в общей фармакопейной статье (ОФС) на методы контроля описано несколько методов анализа. Если в фармакопейной статье или нормативной документации не указано, какой из методов используется, то применяют первый метод, описанный в ОФС.

Молекулярная масса. Под молекулярной массой описанных в фармакопее соединений понимают относительную молекулярную массу, которая рассчитывается по таблице относительных атомных масс 1997 г., принятой Международным союзом по теоретической и прикладной химии (IUPAC) и основанной на шкале углерода-12.

Постоянная масса. Массу следует считать постоянной, если разность результатов двух последующих взвешиваний не превышает 0,5 мг для 1,0 г взятого вещества.

Термин «невесомый» означает, что масса не превышает 0,5 мг.

Пределы содержания. Указываемые пределы основываются на результатах, полученных в рамках аналитической практики; в них уже учтены обычные аналитические погрешности, допустимый разброс при производстве и приготовлении, а также ухудшение качества в процессе хранения в пределах, которые считаются приемлемыми.

Если в разделе «Количественное определение» для индивидуальных веществ не указан верхний предел содержания, следует считать, что последний составляет 100,5 % определяемого вещества.

В тех случаях, когда содержание вещества в препарате выражается в пересчете на сухое или безводное вещество, следует понимать, что потеря в массе при высушивании или содержание воды определены тем методом, который описан в соответствующей фармакопейной статье или нормативной документации.

Растворимость – показатель приблизительной растворимости фармацевтических субстанций и вспомогательных веществ, характеризующий их способность растворяться в растворителях различной полярности при фиксированной температуре.

Растворители. Если для растворов не указан растворитель, то подразумевают водные растворы.

Под названием «вода», как растворитель, если нет особых указаний, следует

понимать воду, соответствующую требованиям фармакопейной статьи «Вода очищенная». Термин «вода дистиллированная» распространяется на «воду очищенную», полученную путем дистилляции.

Под показателем качества лекарственного средства «Вода» следует понимать определение содержания в лекарственном средстве воды с использованием метода Фишера (полумикрометода и микрометода) или метода дистилляции в соответствии с ОФС «Определение воды».

Под названием «спирт», если нет особых указаний, следует понимать спирт этиловый 96 %, «этанол» – спирт этиловый абсолютированный; под названием «эфир» – эфир диэтиловый.

При определении спирта в лекарственных препаратах под процентом подразумевают объемный процент.

Если указано, что при приготовлении смеси растворителей их берут в соотношении а:в, то имеется в виду соотношение объемов. Например, соотношение гексан – бензол 1:3 означает, что смешивают 1 объем гексана с 3 объемами бензола.

Растворы. Под принятым способом обозначения концентрации растворов твердых веществ в различных растворителях 1:10, 1:2 и т.д. следует подразумевать содержание массовой доли вещества в указанном объеме раствора, т.е. при приготовлении раствора 1:10 следует брать 1 г вещества и растворителя до получения 10 мл раствора; при приготовлении раствора 1:2 следует брать 1 г вещества и растворителя до получения 2 мл раствора и т.д.

Под обозначением «ч» подразумевают массовые части.

Обозначение «ppm» (частей на миллион) подразумевает массовое соотношение.

Процентная концентрация раствора может иметь одно из трех значений:

- массовый процент – % (м/м) – число граммов вещества в 100 г раствора;

- массо-объемный процент – % (м/о) – число граммов вещества в 100 мл раствора;

- объемный процент, % (о/о), – число миллилитров жидкого вещества в 100 мл раствора.

Если «%» используется без обозначения (м/м, м/о или о/о), то подразумевается массовый процент для смесей твердых веществ, массо-объемный процент для растворов или суспензий твердых веществ в жидкостях, объемный процент для растворов жидкостей в жидкостях и массо-объемный процент для растворов газов в жидкостях. Например, 1 % раствор приготавливают растворением 1 г твердого вещества или 1 мл жидкости в растворителе с получением в последующем 100 мл раствора.

Растворы, используемые в рамках оценки качества лекарственных средств,

проводимой в соответствии с требованиями фармакопейных статей и/или нормативной документации, должны выдерживать установленные для них сроки годности.

Реактивы. В случае, если квалификация реактивов не указана, подразумевают квалификацию «чистый для анализа».

Сухое место. Под термином «сухое место» понимают влажность не более 50 %.

Температура. Помимо конкретного указания температуры используют также следующие термины:

Глубокое замораживание	ниже – 18 ºС
В морозильной камере	от – 5 до – 18 ºС
В холодном месте, в холодильнике, холодный	от +2 до +8 ºС
В прохладном месте, прохладный	от +8 до +15 ºС
При комнатной температуре	от +15 до +25 ºС
Теплый	от +40 до +50 ºС
Горячий	от +80 до +90 ºС
Температура водяной бани	от +98 до +100 ºС
Температура ледяной бани	0 ºС

Под «водяной баней» понимают кипящую водяную баню, если в фармакопейной статье не указана температура нагревания.

Испытания следует проводить при комнатной температуре, если нет других указаний.

Если в тесте «Потеря в массе при высушивании» температурный интервал не указан, то подразумевается, что он равен ± 2 ºС от указанного значения.

Точность измерения. При описании навесок и объемов необходимое для проведения испытания количество вещества или его раствора в фармакопейных статьях указывают с той или иной точностью в зависимости от конкретного испытании.

Если значения массы навесок или объемов не используют для дальнейших расчетов, то точность их взятия (отвешивания, отмеривания) должна совпадать с последним указанным знаком.

Понятие «около» означает допустимое отклонение от заданного значения в пределах ± 10 %.

«Точная навеска» означает взвешивание на аналитических весах, а также регистрацию полученного значения для дальнейшего учёта в расчётах.

При определении массы в граммах с точностью более 4 десятичных знаков следует пользоваться весами с метрологическими или техническими характеристиками, обеспечивающими требуемую точность взвешивания.

Объёмы отмеряют следующим образом. Если после запятой стоит «0» или число,

заканчивающееся нулем (например, 10,0 мл или 0,50 мл), требуемый объем отмеряют с помощью пипетки Мора, мерной колбы или бюретки. В остальных случаях можно использовать градуированный мерный цилиндр или градуированную пипетку. Микролитры отмеряют с помощью микропипетки или микрошприца.

Фильтрование. Если не указана марка фильтра, то подразумевают любой фильтр.

Хранение. Термин «не требует особых условий» означает хранение при комнатной температуре.

Единицы международной системы (СИ), используемые в фармакопее **ОФС.1.1.0002.15**

МЕЖДУНАРОДНАЯ СИСТЕМА ЕДИНИЦ (СИ)

Международная система единиц в настоящее время включает в себя два класса единиц физических величин: основные единицы и производные единицы[1]. Класс основных единиц состоит из семи независимых единиц, определения которых приведены в табл. 1.

Производными единицами системы называются единицы физических величин, которые могут быть получены из основных единиц посредством соответствующих алгебраических отношений. Единицы таких величин, используемых фармакопеей, приведены в табл. 2.

Таблица 1 – Основные единицы СИ

Величина		**Единица**		**Определение**
Наименование	**Символ**	**Наименование**	**Обозначение**	
Длина	*l*	метр	м	Метр есть длина пути, проходимого светом в вакууме за интервал времени 299 792 458 $с^{-1}$.

[1] Используемые определения единиц Международной системы (СИ) приняты Международным комитетом мер и весов.

Существовавший ранее отдельный класс вспомогательных единиц, содержащий две единицы: угол на плоскости и пространственный угол, 20-й Конференцией (1995 г.) Международного комитета мер и весов включен в класс производных единиц.

Масса	m	килограмм	кг	Килограмм есть единица массы, равная массе международного прототипа килограмма.
Время	t	секунда	с	Секунда есть время, равное 9 192 631 770 периодам излучения, соответствующего переходу между двумя сверхтонкими уровнями основного (квантового) состояния атома цезия-133 в покое при 0 К при отсутствии возмущения внешними полями.
Электрический ток (сила электрического тока)	I	ампер	А	Ампер есть сила неизменяющегося тока, который при прохождении по двум параллельным прямолинейным проводникам бесконечной длины и ничтожно малой площади кругового поперечного сечения, расположенным в вакууме на расстоянии 1 м один от другого, вызвал бы на каждом участке проводника длиной 1 м силу взаимодействия, равную $2 \cdot 10^{-7}$ Н.
Термодинамическая температура	T	кельвин	К	Кельвин есть единица термодинамической температуры, равная 1/273,16 части термодинамической температуры тройной точки воды.
Количество вещества	n	моль	моль	Моль есть количество вещества системы, содержащей столько же структурных элементов, сколько содержится атомов в углероде-12 массой 0,012 кг. Моль также может отражать количество специализированных структурных единиц, таких как атомы, молекулы, ионы, электроны и другие частицы или специфицированные группы частиц.

Сила света	I_v	кандела	кд	Кандела есть сила света в заданном направлении источника, испускающего монохроматическое излучение частотой $540 \cdot 10^{12}$ Гц, энергетическая сила света которого в этом направлении составляет 1/683 Вт/ср.

Таблица 2– Производные единицы СИ и их соответствие другим единицам

Величина		**Единица**				**Преобразование иных единиц в единицы СИ**
Наименование	**Символ**	**Наименование**	**Обозначение**	**Выражение**		
				основные единицах СИ	**иные единицы СИ**	
Плоский угол	*l*	радиан	рад	$м \cdot м^{-1} = 1$		1 рад = $180^o/\pi$
Телесный угол	*I*	стерадиан	ср	$м^2 \cdot м^{-2} = 1$		
Волновое число	*k*	метр в минус первой степени	$м^{-1}$	$м^{-1}$		
Длина волны	λ	микрометр	мкм	10^{-6} м		
		нанометр	нм	10^{-9} м		
Площадь	*A,S*	квадратный метр	$м^2$	$м^2$		
Объем, вместимость	*V*	кубический метр	$м^3$	$м^3$		1 мл = 1 $см^3$ = 10^{-6} $м^3$
Частота	ν	герц	Гц	$с^{-1}$		
Плотность	ρ	килограмм на кубический метр	$кг/м^3$	$кг \cdot м^{-3}$		1 г/мл = 1 $г \cdot см^{-3}$ = 1 кг/л = 10^3 $кг \cdot м^{-3}$
Скорость	*v*	метр в секунду	м/с	$м \cdot с^{-1}$		

Сила	*F*	ньютон	Н	м·кг·с$^{-2}$		1 дин = 1 г·см·с$^{-2}$ = 10^{-5} Н 1 kp = 9,80665 Н
Давление	*P*	паскаль	Па	кг · м$^{-1}$ · с$^{-2}$	Н·м$^{-2}$	1 дин/см^2 = 10^{-1} Па = 10^{-1} Н·м$^{-2}$ 1 атм. = 101 325 Па = 101,325 кПа 1 бар = 10^5 Па = 0,1 МПа 1 мм рт.ст. =133,322 Па 1 Torr = 133,322 Па 1 psi = 6,894757 кПа
Динамическая вязкость	η	паскаль-секунда	Па·с	кг· м$^{-1}$·с$^{-1}$	Н·с·м$^{-2}$	1 П = 10^{-1} Па·с = 10^{-1} Н·с·м$^{-2}$ 1 сП = 10^{-3} кг·м$^{-1}$· с$^{-1}$ = 1 мПа·с
Кинематическая вязкость	v	квадратный метр на секунду	м^2/с	м^2·с$^{-1}$	Па·с·м^3·кг$^{-1}$ Н·м·с×·кг$^{-1}$	1 Ст = 1см^2·с$^{-1}$ = 10^{-4}·м^2·с$^{-1}$
Энергия, работа, количество теплоты	*J, E*	джоуль	Дж	кг· м^2 · с$^{-2}$	Н·м	1 эрг = 1 см^2·г·с$^{-2}$ = 1 дин·см = 10^{-7} Дж 1 кал = 4,1868 Дж
Мощность, тепловой поток, поток излучения, мощность излучения	*P*	ватт	Вт	кг· м^2 · с$^{-3}$	Н·м·с$^{-1}$ Дж·с$^{-1}$	1 эрг/с =1 дин·см·с$^{-1}$ = 10^{-7} Вт = 10^{-7} Н·м·с$^{-1}$ = 10^{-7} Дж·с$^{-1}$
Поглощенная доза ионизирующего излучения	*D*	грэй	Гр	м^2·с$^{-2}$		1 рад = 10^{-2} Гр
Электрическое напряжение, электрический потенциал, электродвижущая сила, разность электрических потенциалов	U	вольт	В	кг· м^2·с$^{-3}$·А$^{-1}$	Вт·А$^{-1}$	

Электрическое сопротивление	*R*	ом	Ом	кг· м^2·с$^{-3}$·А$^{-2}$	В·А$^{-1}$	
Температура Цельсия	Θ	градус Цельсия	°С	К		
Количество электричества, электрический заряд	*Q*	кулон	Кл	А · с		
Активность нуклида в радиоактивном источнике (активность радионуклида)	*A*	беккерель	Бк	с$^{-1}$		1Ки = 37·10^9 Бк =37·10^9 с$^{-1}$
Молярная концентрация компонента	*c*	моль на кубический метр	моль/м^3	моль·м$^{-3}$		1 моль/л = 1 М = 1 моль/дм^3 = 10^3 моль/м^3
Массовая концентрация компонента	ρ	килограмм на кубический метр	кг/м^3	кг·м$^{-3}$		1 г/л = 1 г/дм^3 = 1 кг·м$^{-3}$

В табл. 3 приведены внесистемные единицы, не входящие в систему СИ, допустимые к применению наравне с единицами СИ, и единицы, временно допустимые к применению.

Таблица 3 – Внесистемные единицы, допустимые и временно допустимые к применению наравне с единицами СИ

Наименование величины	**Единица**		**Соотношение с единицей СИ**
Масса	тонна	т	1 т = 1·10^3 кг
Время	минута	мин	1 мин = 60 с
	час	ч	1 ч = 60 мин = 3600 с
	сутки	сут	1 сут = 24 ч = 86400 с
Плоский угол	градус	°	1 ° = (π/180) рад = 1,745329…·10^{-2} рад
Объем, вместимость	литр	л	1 л = 1 дм^3 = 1·10^{-3} м^3
Частота вращения	оборот в секунду	об/с	1 об/с = 1 с$^{-1}$
	оборот в	об/мин	1 об/мин = (1/60) с$^{-1}$

	минуту		
Энергия	Электрон - вольт	эВ	$1{,}60218 \cdot 10^{-19}$ Дж (приблизительно)

Множительные приставки, используемые для образования обозначений десятичных дольных и кратных единиц, приведены в табл. 4.

Таблица 4 – Множители и приставки, используемые для образования обозначений десятичных кратных и дольных единиц СИ

Множитель	**Приставка**	**Обозначение**	**Множитель**	**Приставка**	**Обозначение**
10^{24}	иотта	И	10^{-1}	деци	д
10^{21}	зетта	З	10^{-2}	санти	с
10^{18}	экса	Э	10^{-3}	милли	м
10^{15}	пета	П	10^{-6}	микро	мк
10^{12}	тера	Т	10^{-9}	нано	н
10^{9}	гига	Г	10^{-12}	пико	п
10^{6}	мега	М	10^{-15}	фемто	ф
10^{3}	кило	к	10^{-18}	атто	а
10^{2}	гекто	г	10^{-21}	зепто	з
10^{1}	дека	да	10^{-24}	иокто	и

В фармакопее для единиц измерения физических величин используются общепринятые сокращения, которые приведены в табл. 5.

Таблица 5 – Сокращения единиц измерения, применяемые в фармакопее

Наименование единицы измерения	Сокращение
Единицы измерения массы	
грамм	г
миллиграмм	мг
Единицы измерения объема (вместимости)	
литр	л
миллилитр	мл
микролитр	мкл
Единицы измерения длины	
метр	м
сантиметр	см
дециметр	дм
Единицы измерения времени	
сутки	сут
час	ч
минута	мин
секунда	с
миллисекунда	мс
микросекунда	мкс
Единицы измерения давления	
паскаль	Па
миллиметр ртутного столба (торр)	мм рт.ст. (торр)
бар	бар
атмосфера	атм
килограмм-сила на квадратный сантиметр	кгс/см^2
фунт-сила на квадратный дюйм	psi
Единицы измерения силы	
ньютон	Н
дина	дин
килопонд	кп
Единицы измерения работы, энергии и количества теплоты	
джоуль	Дж
эрг	эрг
калория	кал
Единица измерения мощности	
ватт	Вт
Единица измерения частоты	

герц	Гц
Единицы температуры	
кельвин	К
градус Цельсия	˚С
Единица измерения динамической вязкости	
пуаз	П
Единица измерения кинематической вязкости	
стокс	Ст
Единицы измерения радиоактивности	
беккерель	Бк
кюри	Ки
Единцы измерения поглощенной дозы ионизирующего излучения	
грей	Гр
рад	рад
Единица измерения силы электрического тока	
ампер	А
Единица измерения электрического потенциала	
вольт	В
Единица измерения электрического сопротивления	
ом	Ом
Единица измерения электрического заряда	
кулон	Кл

Примечания.

1. Радиан – угловая величина дуги между двумя радиусами окружности, равная радиусу.
2. Условия центрифугирования определяются отношением величины центробежного ускорения к средней величине ускорения свободного падения (*g*), которая принимается равной 9,80665 м·с$^{-2}$.
3. Некоторые величины применяют без размерности (относительная плотность; оптическая плотность; удельный и молярный показатели поглощения; показатель преломления)».

Оборудование **ОФС.1.1.0003.15**

Взамен ГФ XII, ч.1, ОФС 42-0033-07

В настоящей статье приведена характеристика оборудования, применяемого в фармакопейном анализе, не описанная в других общих фармакопейных статьях.

ФИЛЬТРЫ

В зависимости от диаметра пор фильтры используются для следующих целей (табл. 1):

Таблица 1– Область применения фильтра в зависимости от диаметра пор

Диаметр пор, мкм	**Область применения фильтра**
Не более 1,0	Бактериологическая фильтрация
1,0 – 10	Ультратонкая фильтрация, отделение микроорганизмов большого диаметра
10 – 40	Аналитическая фильтрация
40 – 100	Тонкая фильтрация
100 – 160	Фильтрация крупных частиц, использование в качестве подложки для других фильтрующих материалов
160 – 500	Фильтрация очень крупных частиц

В табл. 2 приведен максимальный диаметр пор стеклянных фильтров различной пористости.

Таблица 2 – Максимальный диаметр пор стеклянных фильтров

различной пористости

Пористость фильтра	Приблизительный максимальный диаметр пор, мкм
ПОР 1,0	менее 1,0
ПОР 1,6	менее 1,6
	1 - 2,5
ПОР 3,0	1,6 -3
	1,6 - 4
	4 - 6
ПОР 10	3 - 10
	4 - 10
ПОР 16	10 - 16
ПОР 40	16 - 40
	40 - 50
ПОР 100	40 - 100
	100 - 120
ПОР 160	100 - 160
	150 - 200
ПОР 250	160 - 250
	200 - 500
ПОР 500	250 - 500

СИТА

Материал сита должен быть индифферентным по отношению к просеиваемому веществу.

Для аналитических процедур используют сита с квадратными отверстиями. Для неаналитических процедур могут быть использованы также сита с круглыми отверстиями, диаметр которых в 1,25 раза превышает размер стороны квадратного отверстия сита соответствующего номера. Требования к степени измельченности приводят в фармакопейной статье с указанием номера сита, соответствующего номинальному размеру стороны отверстия в микрометрах, который приводится в скобках после названия вещества.

Максимальный допуск для размера отверстия (+ X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{2 \cdot (\omega^{0.75})}{3} + 4 \cdot (\omega^{0.25}), \quad (1)$$

где ω – номинальный размер отверстия.

Не должно быть отверстий, размер которых превышает номинальный размер более чем на величину *X*.

Допуск для среднего значения размера отверстия (± *Y*) вычисляют по формуле:

$$Y = \frac{\omega^{0.98}}{27} + 1{,}6. \quad (2)$$

Средний размер отверстия не должен отклоняться от номинального размера более чем на величину ± *Y*.

Промежуточный допуск (+ *Z*) вычисляют по формуле:

$$Z = \frac{X+Y}{2}. \quad (3)$$

Не более чем 6 % общего числа отверстий могут иметь размеры между «номинальным + *X*» и «номинальным значением + *Z*».

Диаметр *d* проволоки, применяемой для плетения металлической проволочной ткани, вставленной в раму, должен находиться в пределах от d_{min} до d_{max}, что соответствует допускам (± 15 %) от рекомендованного номинального диаметра. Диаметр проволоки в ситах должен быть одинаковым по всей площади сита.

Номер сита (номинальный размер отверстий в мкм), допуски для отверстий, диаметр проволоки и допустимые пределы от ее номинального диаметра представлены в табл. 3.

Таблица 3 – Характеристика сит, применяемых в производстве и контроле лекарственных средств

Номер сита (номинальный размер отверстия, мкм)	**Допуск для отверстия, мкм**			**Диаметр проволоки, мкм**		
	Максимальный допуск для отверстия	**Допуск для среднего значения размера отверстия**	**Промежуточный допуск**	**Рекомендованный номинальный диаметр**	**Допустимый предел**	
	$+X$	$\pm Y$	$+Z$	d	d_{max}	d_{min}
11200	770	350	560	2500	2900	2100
8000	600	250	430	2000	2300	1700
5600	470	180	320	1600	1900	1300
4000	370	130	250	1400	1700	1200
2800	290	90	190	1120	1300	950
2000	230	70	150	900	1040	770
1400	180	50	110	710	820	600
1000	140	30	90	560	640	480
710	112	25	69	450	520	380
500	89	18	54	315	360	270
355	72	13	43	224	260	190
250	58	9,9	34	160	190	130
180	47	7,6	27	125	150	106
125	38	5,8	22	90	104	77
90	32	4,6	18	63	72	54
63	26	3,7	15	45	52	38
45	22	3,1	13	32	37	27
38	–	–	–	30	35	24

Отбор проб **ОФС.1.1.0004.15**
Взамен ГФ X

Взамен ст. ГФ XI

Настоящая общая фармакопейная статья устанавливает общие требования к отбору проб (выборок) произведенных (изготовленных) лекарственных средств, а также материалов для определения соответствия их качества требованиям нормативной документации.

Отбор проб лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов осуществляют в соответствии с требованиями ОФС «Отбор проб лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Основные термины и определения

Выборка (проба) – одна или несколько выборочных единиц, отобранных в соответствии с установленной процедурой выборки из генеральной совокупности.

Выборочная единица – определенное количество лекарственных средств или материалов, образующее единство и взятое из одного места в одно время для формирования части выборки.

Генеральная совокупность – контролируемая серия (партия).

Готовая продукция (готовый продукт, конечный продукт) – лекарственное средство, прошедшее все этапы технологического процесса, в том числе окончательную упаковку.

Деление пробы – процесс отбора одной или нескольких проб из пробы нештучной нерасфасованной продукции таким способом, как нарезание, механическое деление или квартование.

Загрязнение (контаминация) – процесс загрязнения лекарственных средств и материалов веществами синтетического или природного происхождения, в том числе микроорганизмами.

Контроль качества – проведение испытаний на соответствие требованиям нормативной документации.

Лекарственные препараты – лекарственные средства в виде лекарственных форм, применяемые для профилактики, диагностики, лечения заболевания, реабилитации, для сохранения, предотвращения или прерывания беременности.

Лекарственные средства – вещества или их комбинации, вступающие в контакт с организмом человека, проникающие в органы, ткани организма человека, применяемые для профилактики, диагностики (за исключением веществ или комбинаций, не контактирующих с организмом человека), лечения заболевания, реабилитации, для сохранения, предотвращения или прерывания беременности и полученные из крови, плазмы крови, из органов, тканей организма человека или животного, растений, минералов методами синтеза или с применением биологических технологий. К лекарственным средствам относятся фармацевтические субстанции и лекарственные препараты.

Нерасфасованная продукция (англо, in bulk product) – лекарственное средство в крупной фасовке, в том числе в определенной лекарственной форме, прошедшее все стадии технологического процесса, кроме упаковки, и предназначенное для последующей расфасовки или производства лекарственных препаратов.

Нормативная документация – документ, содержащий перечень определяемых по результатам соответствующих экспертиз показателей качества лекарственного средства для медицинского применения, методов контроля его качества и установленный его производителем.

Образец (для испытаний) (выборка конечная (финальная) – определенное количество конкретного лекарственного средства или

материала, используемое в качестве представителя этих объектов при испытании.

Образец репрезентативный – образец, полученный с использованием такой процедуры выборки, которая гарантирует, что разные части серии или разные свойства неоднородной продукции представлены пропорционально.

Объединенная проба – проба лекарственного средства или материалов, получаемая объединением нескольких точечных проб, взятых из этого же лекарственного средства или материалов, предназначенная для проведения испытаний на соответствие требованиям нормативной документации.

Объем выборки – число выборочных единиц в выборке.

Отбор проб – действия по изъятию (выборке) проб лекарственных средств и материалов для проведения их испытаний на соответствие требованиям нормативной документации или иных целей.

План отбора проб – план, который устанавливает количество выборочных единиц, необходимых для проведения испытаний и соответствующих этому критерию приемлемости.

Проба – определенное количество лекарственных средств и материалов, отобранных из контролируемой серии (партии).

Процедура отбора проб – все операции по отбору проб, которые должны быть проведены с определенным лекарственным средством или материалом для реализации определенной цели.

Серия (партия) – количество лекарственного средства или материалов одного наименования, произведенного в одном технологическом цикле или в течение определенного интервала времени в одних и тех же условиях и одновременно представленного на контроль. Качество серии (партии) должно быть удостоверено одним документом.

Тара – основной элемент упаковки, предназначенный для размещения готовой продукции и материалов.

Тара транспортная – тара, предназначенная для упаковки, хранения и транспортирования готовой продукции и материалов, образующая самостоятельную транспортную единицу. Для лекарственных средств тара транспортная обеспечивает транспортирование определенного количества лекарственных средств в потребительской или групповой упаковке (ящик, мешок, бочка, фляга).

Точечная проба – количество нерасфасованной продукции или материалов, взятое единовременно за один прием, из одного места, из большего объема этих же объектов.

Упаковка – средство или комплекс средств, обеспечивающих защиту лекарственных средств от повреждения и потерь, окружающей среды, от загрязнений, а также обеспечивающих процесс обращения лекарственных средств. Различают первичную и вторичную упаковку в зависимости от непосредственного контакта с лекарственным средством.

Упаковка групповая – упаковка, объединяющая одинаковые упаковочные единицы в потребительской упаковке, скреплённая с помощью упаковочных или обвязочных материалов.

Упаковка потребительская (вторичная) – упаковка, поступающая к потребителю и обеспечивающая сохранность и неизменность свойств лекарственного препарата в течение установленного срока годности.

Упаковочная единица – упаковка, содержащая определенное количество готовой продукции.

Фармацевтическая субстанция – лекарственное средство в виде одного или нескольких обладающих фармакологической активностью действующих веществ вне зависимости от природы происхождения, которое предназначено для производства, изготовления лекарственных препаратов и определяет их эффективность.

Примечание. Определения, приведенные выше, относятся к терминам настоящей ОФС и могут иметь иные значения в других контекстах.

Общие положения

Отбор проб (выборок) произведенных (изготовленных) лекарственных средств и материалов, используемых в процессе их производства (изготовления) или характеризующих стадии технологического процесса производства (изготовления), должен проводиться в соответствии с утвержденной процедурой отбора проб, если иное не указано в нормативной документации.

Процедура отбора проб должна соответствовать определенным целям отбора, виду испытаний и специфике отбираемых образцов.

При проведении процедуры отбора проб должны быть предусмотрены и учтены:

– план или схема отбора проб;

– объем и тип отбора проб;

– место и время отбора проб;

– извлечение и подготовка проб для испытаний;

– специальные меры предосторожности, особенно в отношении стерильных и опасных лекарственных средств или материалов;

– перечень используемого оборудования для отбора проб;

– требования по очистке и хранению оборудования для отбора проб и др.;

– тип, характеристика и маркировка тары для хранения проб;

– параметры окружающей среды при отборе и подготовке проб для испытаний.

При формировании плана отбора проб необходимо принимать во внимание конкретные цели отбора проб; физико-химические, биологические и другие свойства исследуемого объекта, его однородность, стабильность, критичность; количество отбираемого образца; риски и последствия, связанные с ошибочными решениями по выбору плана отбора.

Отбору проб подлежат:

– лекарственные препараты (серия);

– промежуточная продукция на критических стадиях процесса производства/изготовления;

– вспомогательные вещества;

– упаковочные и печатные материалы.

Правила отбора проб

Пробы отбирают от генеральной совокупности (партии/серии), состоящей из выборочных единиц.

При отборе проб, характеризующих стадии технологического процесса производства (изготовления), генеральная совокупность устанавливается внутренними документами предприятия-производителя (изготовителя) лекарственных средств.

В процессе проведения отбора проб необходимо учитывать факторы, которые должны контролироваться с тем, чтобы обеспечить достоверность результатов испытаний.

Методика отбора должна предусматривать предотвращение загрязнения лекарственных средств и материалов, из которых отбираются пробы, самих отбираемых проб, а также других лекарственных средств, материалов и окружающей среды.

Методика отбора проб материалов при внутрипроизводственном процессе должна учитывать критические стадии процесса производства (изготовления) лекарственных средств и включать установленные контрольные точки отбора проб (емкости, места отбора и т.п.).

Не допускается отбор проб одновременно от двух и более наименований лекарственных средств или материалов, двух и более серий (партий) готовой продукции во избежание ошибок при отборе проб. К отбору от следующей серии (партии) готовой продукции или материалов можно приступать только после выполнения всей процедуры отбора от предыдущей серии (партии).

Перед отбором проб необходимо провести внешний осмотр каждой упаковочной единицы всей серии (партии) готовой продукции или материалов. При осмотре необходимо обратить внимание на соответствие упаковки, в которой находится готовая продукция или материалы, и ее маркировки требованиям нормативной документации, определить количество готовой продукции и материалов, целостность и наличие пломб на упаковке, правильность оформления сопроводительной документации и соответствия в ней данных серии (партии) готовой продукции или материалов, предназначенной для отбора проб.

Пробы отбирают только из неповрежденных, укупоренных и упакованных согласно нормативной документации упаковочных единиц. Готовая продукция и материалы в поврежденной упаковке, не соответствующей требованиям нормативной документации, должна быть отклонена.

Примечание. При соответствующем указании в документации предприятия-производителя допускается отбор проб от каждой единицы готовой продукции или материалов из поврежденной упаковки для проведения полного контроля качества анализируемых объектов.

Методы отбора проб

Случайный отбор проб. Пробы могут быть отобраны методом случайного отбора от установленного количества выборочных единиц при выборочном контроле; от каждой выборочной единицы при сплошном контроле или другим методом в соответствии с разработанным статистически обоснованным планом отбора.

Для осуществления случайного отбора проб необходимо последовательно пронумеровать каждую выборочную единицу, затем, воспользовавшись таблицей случайных чисел (или сгенерированными компьютером случайными числами), установить, из каких случайных выборочных единиц производить отбор необходимого количества проб.

Многоступенчатый отбор проб. При отсутствии указаний в фармакопейных статьях при отборе образцов (проб, выборок) лекарственных средств для проведения их испытаний на соответствие требованиям нормативной документации проводят многоступенчатый отбор проб, считая при этом, что серия (партия) лекарственного средства является однородной продукцией. Аналогичным образом осуществляется отбор материалов.

При многоступенчатом отборе пробу образуют по ступеням и готовую продукцию или материалы в каждой ступени отбирают случайным образом в пропорциональных количествах из упаковочных единиц, отобранных в предыдущей ступени. Число ступеней определяется видом упаковки.

Например, если продукция в потребительской (вторичной) упаковке помещена в групповую упаковку, а затем и в транспортную тару, то возможен трехступенчатый отбор проб.

I ступень: отбор единиц транспортной тары (ящиков, коробок, мешков и др.).

II ступень: отбор упаковочных единиц групповой упаковки (коробок, пакетов, рулонов и др.).

III ступень: отбор продукции в потребительской (вторичной) упаковке (флаконов, туб, контурных упаковок и др.).

Для расчета количества отбираемых упаковочных единиц (N) на каждой ступени используют формулу для однородной продукции:

$$N = 0{,}4\sqrt{n}, \qquad (1)$$

где n – общее количество упаковочных единиц данной ступени одной серии (партии).

Полученное в результате подсчета по формуле (1) дробное число округляют в сторону увеличения до целого числа, оно должно быть не менее 3 и не более 30.

В случае недостаточного количества упаковочных единиц для проведения испытания повторно отбирают упаковочные единицы, как указано выше.

Из отобранных на последней ступени упаковочных единиц после контроля по внешнему виду берут пробу (выборку) для исследования лекарственного средства на соответствие требованиям нормативной документации в количестве, необходимом для реализации определенной цели (с учетом испытания на микробиологическую чистоту, стерильность, испытания парентеральных и офтальмологических растворов на механические включения и т.п.).

Примечание. Для твердых дозированных лекарственных средств количество единиц образцов для проведения микробиологического контроля рассчитывают путем деления требуемого количества образца в граммах (50 г) на среднюю массу таблетки, драже, капсулы или суппозитория.

Если подлинность однородной продукции достоверна, то для расчета количества отбираемых упаковочных единиц следует использовать формулу:

$$N = 1 + \sqrt{n}, \qquad (2)$$

Полученное в результате подсчета по формуле (2) дробное число округляют в сторону увеличения или уменьшения до целого числа путем простого округления. Если упаковочных единиц 4 и менее, то отбираются все единицы.

Примечание. Не рекомендуется использовать формулу (2) при приемочном (входном) контроле материалов, предназначенных для производства лекарственных средств.

Если продукция неоднородная и/или получена из неизвестного источника, для расчета количества отбираемых упаковочных единиц можно использовать формулу:

$$N = 1,5\sqrt{n}, \qquad (3)$$

Полученное в результате подсчета по формуле (3) дробное число округляют в сторону увеличения до целого числа.

Требования к отбору проб из нерасфасованных лекарственных средств и материалов

Проба из нерасфасованных лекарственных средств или материалов должна представлять собой объединенные точечные пробы, взятые примерно в равных количествах, смешанные и, при необходимости, уменьшенные до

массы (объема) образца, необходимой для испытания лекарственного средства или материалов на соответствие требованиям нормативной документации для реализации определенной цели.

Примечание. Если каждую точечную пробу анализируют по отдельности, то их массы (объемы) могут быть неодинаковыми, но не менее количества, определенного нормативным документом для конкретного вида испытаний.

Для отбора проб применяют пробоотборники, соответствующие физическому состоянию, виду упаковки продукции, изготовленные из материала, который не загрязняет продукцию и не реагирует с ней. Вместимость пробоотборника должна быть достаточной для отбора всей точечной пробы, а его конструкция должна быть доступна для очистки. Используемые пробоотборники должны быть чистыми и сухими, в случае использования пробы для определения микробиологической чистоты – стерильными.

Отбор точечных проб проводят подходящим пробоотборником с разных уровней: верхнего, среднего и нижнего слоев каждой отобранной упаковочной единицы. Для отбора проб жидкостей их сначала тщательно перемешивают; в случае, если перемешивание затруднено (большие емкости), точечные пробы отбирают без перемешивания из разных слоев.

В случае отбора проб продукции для проверки ее однородности точечные пробы сыпучей, вязкой, гетерогенной и другой установленной продукции исследуют по отдельности и при внешнем осмотре убеждаются в однородности отобранных точечных проб.

Примечание. Признаками неоднородности могут быть различия по форме, размеру или цвету частиц в кристаллической, гранулированной или порошкообразной массе твёрдого вещества; влажные корки на гигроскопических веществах; обнаруженные твердые вещества в жидких субстанциях; расслоение жидких субстанций и др.

Если точечные пробы однородны, то их объединяют, тщательно перемешивая, на чистой сухой поверхности или в подходящей емкости для получения объединенной пробы.

При необходимости для деления (уменьшения) объединенной пробы применяют обоснованные ручные или автоматизированные методы.

Требования к отбору проб лекарственных препаратов в потребительской упаковке

Лекарственные препараты одной серии одного производителя, полученные от одного поставщика, можно считать однородными.

Выборка лекарственных препаратов должна состоять из ненарушенных упаковочных единиц.

Объем выборки лекарственных препаратов определяется целью отбора, требованиями метода испытания, видом лекарственной формы и другими факторами.

Отбор выборок лекарственных препаратов осуществляется в соответствии с требованиями ОФС на конкретные лекарственные формы, на методы испытаний или в соответствии с требованиями фармакопейных статей.

Упаковка, маркировка, хранение отобранных образцов

Отобранные образцы (конечная, финальная выборка) лекарственных средств и материалов помещают в подготовленную тару и/или упаковывают, при необходимости пломбируют или опечатывают на месте отбора.

Упаковка должна обеспечивать пригодность пробы для проведения последующих испытаний и не изменять исследуемые показатели качества при транспортировании и хранении.

Отбор проб нерасфасованной продукции или материалов должен осуществляться в стерильную тару.

Пробы, прошедшие отбор, должны соответствующим образом идентифицироваться с использованием единой маркировки и оформляться актом отбора или другим документом, включающим дату, время и место отбора, условия окружающей среды при отборе, фамилию, имя и отчество лица, проводившего отбор, и другую необходимую информацию.

До и после проведения испытаний пробы должны храниться в отдельном помещении в соответствии с требованиями нормативной документации на лекарственные средства или материалы. Условия в помещении должны обеспечивать сохранность проб в течение срока хранения.

Упаковочные единицы, из которых были отобраны пробы, должны быть аккуратно вскрыты и закрыты; на них должна быть нанесена маркировка, показывающая, что из этой упаковки (тары) были взяты пробы, и уточнено оставшееся количество анализируемого объекта.

Если для отбора пробы был сделан прокол упаковки, то после отбора необходимо запечатать место прокола и промаркировать.

Требования к помещениям для отбора проб, оборудованию и персоналу

Все операции, связанные с отбором проб, следует выполнять должным образом в отдельном помещении или специально отведенном месте с использованием надлежащего оборудования и инструментов для отбора проб. Используемое при отборе проб испытательное оборудование и средства измерений должны пройти в установленном порядке аттестацию или поверку.

Персонал, выполняющий отбор проб, должен иметь соответствующую подготовку.

Документация по процедуре отбора проб должна находиться в местах отбора проб и быть доступной для персонала.

Перед отбором проб персонал, ответственный за отбор, должен изучить необходимую информацию, связанную с техникой безопасности и охраной своего здоровья, содержащую необходимые меры предосторожности и требования к персоналу по отбору проб и окружающей среде.

Персонал, занятый отбором проб, должен строго соблюдать инструкции, регламентирующие состояние здоровья и требования личной гигиены.

Пробоотборщики должны носить соответствующую защитную одежду, специальную обувь для выполнения задания, используя при необходимости перчатки, фартуки, очки, респираторы и другие средства индивидуальной защиты.

При отборе проб запрещается принимать пищу, пить, курить, а также хранить еду, средства для курения в специальной одежде или месте отбора проб.

При отборе проб необходимо соблюдать меры предосторожности и требования безопасности, учитывая токсичность, огне- и взрывоопасность, гигроскопичность и другие свойства продукции, а также меры, направленные на предохранение отбираемых проб от повреждения и загрязнения во время работы с ними, требования к их упаковке, транспортированию, складированию и хранению с учетом требований и методов последующих испытаний.

При отборе проб лекарственных средств и материалов, относящихся к наркотическим средствам, психотропным веществам и их прекурсорам, следует руководствоваться действующими законодательными документами Российской Федерации и фармакопейными статьями или другой нормативной документацией.

Лица, ответственные за отбор проб, должны иметь безопасный доступ и выход из зоны отбора проб и места хранения образцов. Помещения хранения образцов должны иметь надлежащее освещение, вентиляцию, внутреннюю организацию, соответствующую требованиям безопасности, связанным с характером отобранных образцов продукции.

Необходимо принимать меры для предотвращения обрушения сложенных вместе в большом количестве упаковок.

Отбор проб лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов	**ОФС.1.1.0005.15** **Взамен ст. ГФ XI, вып.1** **Взамен ОФС 42-0013-03**

Настоящая общая фармакопейная статья устанавливает единые требования к отбору проб лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов с целью определения соответствия их качества требованиям нормативной документации.

Основные термины и определения

Выборка (проба) – одна или несколько выборочных единиц, отобранных в соответствии с установленной процедурой выборки из генеральной совокупности.

Выборочная единица – определённое количество лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов, образующее единство и взятое из одного места в одно время для формирования части выборки.

Генеральная совокупность – контролируемая партия/серия.

Готовая продукция (готовый продукт, конечный продукт) – лекарственное средство, прошедшее все этапы технологического процесса, в т.ч. окончательную упаковку.

Загрязнение (контаминация) – процесс загрязнения лекарственных средств веществами синтетического или природного происхождения, в том числе микроорганизмами.

Контроль качества – проведение испытаний на соответствие требованиям нормативной документации.

Лекарственные средства – вещества или их комбинации, вступающие в контакт с организмом человека или животного, проникающие в органы,

ткани организма человека или животного, применяемые для профилактики, диагностики (за исключением веществ или их комбинаций, не контактирующих с организмом человека или животного), лечения заболевания, реабилитации, для сохранения, предотвращения или прерывания беременности и полученные из крови, плазмы крови, из органов, тканей организма человека или животного, растений, минералов методами синтеза или с применением биологических технологий. К лекарственным средствам относятся фармацевтические субстанции и лекарственные препараты.

Лекарственное растительное сырье (ЛРС) – свежие или высушенные растения либо их части, используемые для производства лекарственных средств организациями-производителями лекарственных средств или изготовления лекарственных препаратов аптечными организациями, ветеринарными аптечными организациями, индивидуальными предпринимателями, имеющими лицензию на фармацевтическую деятельность.

Лекарственный растительный препарат (ЛРП) – лекарственный препарат, произведенный или изготовленный из одного вида лекарственного растительного сырья или нескольких видов такого сырья и реализуемый в расфасованном виде во вторичной (потребительской) упаковке.

Нормативная документация – документ, содержащий перечень определяемых по результатам соответствующих экспертиз показателей качества лекарственного средства для медицинского применения, методов контроля его качества и установленный его производителем.

Образец репрезентативный – образец, полученный с использованием такой процедуры выборки, которая гарантирует, что разные части партии/серии или разные свойства неоднородной продукции представлены пропорционально.

Объединённая проба – проба ЛРС/ЛРП, получаемая объединением нескольких точечных проб/потребительских упаковок, предназначенная для

выделения проб для проведения испытания на соответствие требованиям нормативной документации.

Объем выборки – число выборочных единиц в выборке.

Отбор проб – действия по изъятию проб ЛРС/ЛРП для проведения их испытаний на соответствие требованиям нормативной документации.

Партия ЛРС – определенное количество цельного, обмолоченного, измельченного, прессованного ЛРС одного наименования, однородно по способу подготовки и показателям качества и оформленно одним документом, удостоверяющим его качество, предназначенное для производства лекарственных средств организациями-производителями лекарственных средств или для изготовления лекарственных препаратов аптечными организациями, ветеринарными аптечными организациями, индивидуальными предпринимателями, имеющими лицензию на фармацевтическую деятельность.

План отбора проб – определенный план, который устанавливает количество выборочных единиц, необходимых для проведения испытаний и соответствующих этому критерию приемлемости.

Проба – определённое количество ЛРС/ЛРП, отобранное из контролируемой партии/серии.

Промежуточная продукция из ЛРС – продукция, полученная путем переработки ЛРС, например, экстракцией, перегонкой, отжимом, разделением на фракции, очисткой, концентрацией или ферментацией. К промежуточной продукции относятся измельченное или превращенное в порошок растительное сырье, настойки, экстракты, эфирные масла и вещества, выделенные в процессе переработки.

Серия ЛРП – определенное количество однородного по всем показателям ЛРП (цельного, измельченного, порошка) одного наименования, произведенное в течение одного технологического цикла или в течение определенного интервала времени, оформленное одним документом,

удостоверяющим его качество. Серия ЛРП формируется из одной или нескольких (но не более 3) партий ЛРС.

Средняя проба – проба ЛРС/ЛРП, выделяемая из объединенной пробы и предназначенная для формирования аналитических проб.

Тара – основной элемент упаковки, предназначенный для размещения ЛРС/ЛРП.

Тара транспортная – тара, предназначенная для упаковки, хранения и транспортирования ЛРС/ЛРП, образующая самостоятельную *транспортную единицу*. Для ЛРП тара транспортная обеспечивает транспортирование определённого количества ЛРП в потребительской или групповой упаковке.

Точечная проба – минимальное количество пробы ЛРС/ЛРП, отобранное из каждой единицы продукции в установленном порядке за один прием для составления объединенной пробы.

Упаковка – средство или комплекс средств, обеспечивающих защиту ЛРП/ЛРС от повреждения и потерь, окружающей среды, загрязнений, а также обеспечивающих процесс обращения лекарственных средств. Различают первичную и вторичную упаковку в зависимости от непосредственного контакта с лекарственным средством.

Упаковка групповая – упаковка, объединяющая одинаковые упаковочные единицы в потребительской упаковке, скреплённая с помощью упаковочных или обвязочных материалов.

Упаковка потребительская (вторичная) – упаковка, поступающая к потребителю и обеспечивающая сохранность и неизменность свойств ЛРС/ЛРП в течение установленного срока годности.

Упаковочная единица – упаковка, содержащая определённое количество готовой продукции.

Примечание. Определения, приведённые выше, относятся к настоящей ОФС и могут иметь иные значения в других контекстах.

Общие положения

Отбор проб (выборок) произведённых (изготовленных) лекарственных средств, материалов и промежуточной продукции, используемых в процессе их производства (изготовления) или характеризующих стадии технологического процесса производства (изготовления), должен проводиться в соответствии с утверждённой процедурой отбора проб, если иное не указано в нормативной документации.

Проверка соответствия качества партии ЛРС/серии ЛРП требованиям нормативной документации должна осуществляться путем отбора репрезентативной пробы и проведения испытаний.

Процедура отбора проб должна соответствовать цели отбора проб, виду анализа, специфике отбираемых образцов и проводиться установленным методом отбора проб с соблюдением действующих санитарно-гигиенических правил и условий, исключающих загрязнение ЛРС/ЛРП и обеспечивающих безопасность персонала.

При проведении процедуры отбора проб должны быть предусмотрены и учтены:

- план или схема отбора проб;
- объём и тип отбора проб;
- место и время отбора проб;
- выборка и подготовка проб для испытаний;
- специальные меры предосторожности, особенно в отношении ядовитых и сильнодействующих ЛРС/ЛРП;
- перечень используемого оборудования для отбора проб;
- требования по очистке и хранению оборудования для отбора проб и др.;
- тип, характеристика и маркировка тары для хранения проб;
- параметры окружающей среды при отборе и подготовке проб для испытаний.

Отбор проб для испытаний должен осуществлять уполномоченный представитель анализирующей организации или подразделения.

Пробы, отобранные в соответствии с настоящей ОФС, предназначены для проведения испытаний ЛРС/ЛРП на соответствие требованиям нормативной документации.

Отбору проб подлежит:

- лекарственное растительное сырье (партия);
- лекарственные растительные препараты (серия);
- промежуточная продукция на критических стадиях процесса производства/изготовления ЛРП.

Правила отбора проб

Пробы отбирают от генеральной совокупности (партии/серии), состоящей из выборочных единиц. При отборе проб, характеризующих стадии технологического процесса производства/изготовления, генеральная совокупность устанавливается внутренними документами предприятия производителя/изготовителя.

Перед отбором проб необходимо произвести внешний осмотр каждой транспортной/упаковочной единицы всей партии/серии. При осмотре необходимо обратить внимание на соответствие упаковки и её маркировки требованиям нормативной документации, установить количество транспортных единиц, целостность и наличие пломб на упаковке, правильность оформления сопроводительной документации.

Пробы отбирают только из неповреждённых транспортных единиц, упакованных согласно нормативной документации.

Каждую партию/серию необходимо рассматривать как отдельную в отношении отбора проб и проведения испытаний. Не допускается отбор проб одновременно от двух наименований, двух партий/серий во избежание ошибок при отборе проб (при перемешивании или перепутывании проб). К отбору от следующей партии ЛРС/серии ЛРП можно переходить только после выполнения всей процедуры отбора от предыдущей партии/серии.

Пробы отбираются в количестве, необходимом для проведения трёх анализов (включая контрольный (партия)/архивный (серия) образцы) в

соответствии с требованиями нормативной документации. При получении сомнительных результатов анализа контролирующая организация/подразделение имеет право провести дополнительный отбор проб для повторных испытаний.

До выдачи разрешения на использование партии ЛРС/серии ЛРП должны содержаться в карантине в условиях, соответствующих требованиям нормативной документации.

Процедура отбора проб оформляется записью в журнале регистрации отбора проб и актом отбора проб. Архивные образцы каждой серии ЛРП следует хранить, как минимум, в течение срока годности серии и одного года после истечения срока годности. Контрольные образцы партии ЛРС должны храниться в течение не менее 2 лет после выпуска серии ЛРП из данной партии ЛРС, если более длительный период не предусмотрен соответствующими нормативно-правовыми актами.

Методы отбора проб

Пробы могут быть отобраны методом случайного отбора от установленного количества выборочных единиц при выборочном контроле; от каждой транспортной единицы при сплошном контроле или другим методом в соответствии с разработанным статистически обоснованным планом отбора.

Для осуществления случайного отбора проб необходимо последовательно пронумеровать каждую транспортную единицу, затем, воспользовавшись таблицей случайных чисел (или сгенерированными компьютером случайными числами), установить, из каких случайных транспортных единиц производить отбор необходимого количества проб.

Отбор проб ЛРС (партия)

Отбор проб от партии ЛРС должен быть проведен в соответствии с порядком, представленным на схеме 1.

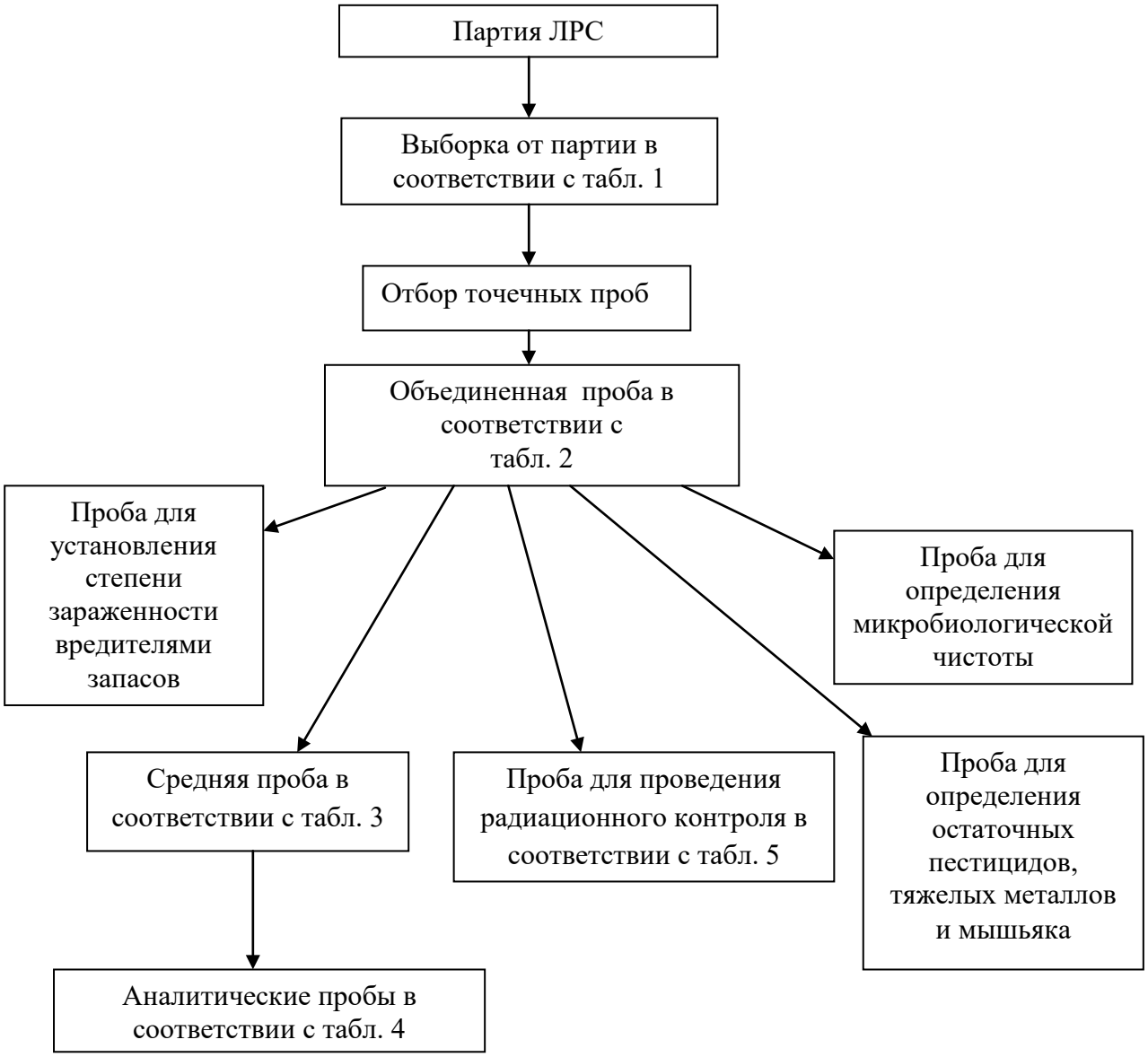


Схема 1 – Порядок отбора проб от партии лекарственного растительного сырья

Для проверки соответствия качества ЛРС требованиям нормативной документации отбирают методом случайного или систематического отбора и составляют выборку из неповрежденных транспортных единиц (согласно табл. 1). Проверку качества ЛРС в поврежденных транспортных единицах производят отдельно от неповрежденных, вскрывая каждую единицу.

Таблица 1 – Объем выборки партии ЛРС/серии ЛРП

Количество транспортных единиц в партии/серии, шт.	**Объем выборки, шт.**
От 1 до 5	Все единицы
От 6 до 50	5 единиц
Свыше 50	Одна транспортная единица от каждых 10 единиц, составляющих партию/серию

Неполные 10 единиц приравнивают к 10 единицам (например, при наличии в партии 51 транспортной единицы объем выборки составляет 6 транспортных единиц).

Попавшие в выборку транспортные единицы вскрывают, и путем внешнего осмотра определяют: однородность сырья по способу подготовки (цельное, резаное, обмолоченное, измельченное, шинкованное); по цвету, запаху, засоренности; наличию плесени, гнили, устойчивого постороннего запаха, не исчезающего при проветривании; засоренность ядовитыми растениями и посторонними примесями (камни, стекло, помет грызунов и птиц и т.д.). Одновременно невооруженным глазом и с помощью лупы (5-10×) определяют наличие вредителей запасов.

При установлении (при внешнем осмотре) неоднородности ЛРС, наличия плесени и гнили, засоренности посторонними растениями в количествах, явно превышающих допустимые пределы содержания примеси, партия может быть принята только после того, как будет рассортирована и вторично предъявлена к сдаче.

При обнаружении в ЛРС затхлого, устойчивого постороннего запаха, не исчезающего при проветривании, ядовитых растений и недопустимых

примесей (помет грызунов и птиц, стекло и др.), зараженности вредителями запасов II и III степеней партия ЛРС не подлежит приемке.

Из каждой транспортной единицы, попавшей в выборку, берут, избегая измельчения, 3 точечные пробы: сверху, снизу и из середины. Из мешков, тюков и кип точечные пробы отбирают на глубине не менее 10 см сверху, затем, после распарывания по шву, из середины и снизу; точечные пробы семян и сухих плодов отбирают зерновым щупом или пробоотборником. Из ящиков первую точечную пробу отбирают из верхнего слоя, вторую – из середины и третью – со дна ящика. Точечные пробы должны быть примерно одинаковыми по массе. Из всех точечных проб, осторожно перемешивая, составляют объединенную пробу.

Масса объединенной пробы должна быть не менее массы, указанной в табл. 2. В случае, если масса объединенной пробы недостаточна для проведения испытаний, отбор точечных проб повторяют.

Таблица 2 – Масса объединенной пробы ЛРС

Наименование сырья	**Масса пробы не менее, г**
Березы почки	1500
Сосны почки	1600
Листья цельные, кроме нижеперечисленных:	1700
сенны листья	1500
толокнянки листья, брусники листья	1400
Листья резаные, обмолоченные, измельченные, порошок	1500
Цветки цельные, измельченные, порошок, кроме нижеперечисленных:	1600
полыни цитварной цветки	1400
ноготков цветки, кукурузы столбики с рыльцами	1500
бузины черной цветки	1300
ромашки аптечной цветки	1500
ромашки далматской цветки	1700
Трава цельная, побеги, кроме нижеперечисленных:	1900
анабазиса побеги	1500
Трава, побеги резаные, обмолоченные, измельченные, порошок	1500
Сочные плоды цельные, измельченные, порошок, кроме нижеперечисленных:	1900
шиповника плоды, боярышника плоды	2000
стручкового перца плоды	2200
Сухие плоды и семена цельные, измельченные, порошок, кроме нижеперечисленных:	2000

Наименование сырья	Масса пробы не менее, г
дурмана индейского, термопсиса, семена льна, хмеля соплодия, фасоли створки плодов	1900
амми плоды, джута семена	1800
ольхи соплодия	1900
Клубни, корни и корневища цельные, кроме нижеперечисленных:	2800
марены корневища и корни, лапчатки корневища	2100
салепа клубни	1900
девясила корневища и корни	3200
папоротника мужского корневища, ревеня корни	3700
туркестанский мыльный корень	12500
солодки корни очищенные	4700
солодки корни неочищенные, барбариса корни, элеутерококка колючего корневища и корни	8200
Корни и корневища резаные, дробленные, измельченные	1900
Корни и корневища порошок	1800
Кора цельная	2800
Кора резаная, измельченная, порошок	1900
Прочее растительное сырье:	
ликоподий	800
спорыньи рожки	900
чага цельная	5300
чага измельченная	2100
ламинарии слоевища цельные	7200
ламинарии слоевища шинкованные	2700
ламинарии слоевища порошок	2100
Сырье животного происхождения:	
бадяга	300

Формирование проб для проведения испытаний

Из объединенной пробы методом квартования выделяют следующие пробы в приведенной ниже последовательности:

– пробу для определения микробиологической чистоты массой 50 г, исключение составляют цельные корни и корневища – 100 г, чага – 200 г;

– пробу для определения степени зараженности вредителями запасов массой 500 г для мелких видов ЛРС и массой 1000 г для крупных видов ЛРС;

– среднюю пробу (для выделения аналитических проб) в соответствии с указаниями табл. 3;

– пробу для проведения радиационного контроля в соответствии с указаниями табл. 5;

– пробу для определения содержания остаточных пестицидов, тяжелых металлов и мышьяка массой 50 г.

Для этого ЛРС разравнивают на гладкой, чистой, ровной, сухой поверхности, предварительно обработанной дезинфицирующим средством, в виде квадрата по возможности тонким равномерным слоем и по диагонали делят на 4 треугольника. Два противоположных треугольника удаляют, а два оставшихся соединяют вместе и перемешивают. Эту операцию повторяют до тех пор, пока не останется количество сырья в двух противоположных треугольниках, соответствующее массе одной из заданных проб. Допустимые отклонения в массе каждой из проб не должны превышать ± 10 %.

Перед квартованием каждой последующей объединенной пробы тщательно дезинфицируют руки, поверхности и инструмент для квартования.

Таблица 3 – Масса средней пробы ЛРС и ЛРП

Наименование ЛРС/ЛРП	**Масса средней пробы, г**
Березы почки	200
Сосны почки	350
Листья цельные, кроме нижеперечисленных:	400
сенны листья	200
толокнянки листья, брусники листья	150
листья резаные, обмолоченные, измельченные, порошок	200
Цветки цельные, измельченные, порошок, кроме нижеперечисленных:	300
полыни цитварной цветки	150
ноготков цветки, кукурузы столбики с рыльцами	200
бузины черной цветки	75
ромашки аптечной цветки	200
ромашки далматской цветки	400
Трава цельная, побеги, кроме нижеперечисленных:	600
анабазиса побеги	200
Трава, побеги резаные, обмолоченные, измельченные, порошок	200
Сочные плоды цельные, измельченные, порошок, кроме нижеперечисленных:	200
шиповника плоды, боярышника плоды	300
стручкового перца плоды	550
Сухие плоды и семена цельные, измельченные, порошок, кроме нижеперечисленных:	300
дурмана индейского, термопсиса, семена льна, хмеля соплодия, фасоли створки плодов	200
амми плоды, джута семена	150

Наименование ЛРС/ЛРП	Масса средней пробы, г
ольхи соплодия	250
Клубни, корни и корневища цельные, кроме нижеперечисленных:	600
марены корневища и корни, лапчатки корневища	400
салепа клубни	200
девясила корневища и корни	1000
папоротника мужского корневища, ревеня корни	1500
туркестанский мыльный корень	10300
солодки корни очищенные	2500
солодки корни неочищенные, барбариса корни, элеутерококка колючего корневища и корни	6000
Корни и корневища резаные, дробленные, измельченные	250
Корни и корневища порошок	150
Кора цельная	600
Кора резаная, измельченная, порошок	200
Прочее растительное сырье:	
ликоподий	100
спорыньи рожки	200
чага цельная	3000
чага измельченная	450
ламинарии слоевища цельные	5000
ламинарии слоевища шинкованные	1000
ламинарии слоевища порошок	400
Сборы измельченные, порошок	250
Сырье животного происхождения:	
бадяга	150

Пробу для определения степени зараженности вредителями запасов герметично упаковывают. Среднюю пробу и пробы для радиационного контроля, микробиологической чистоты, остаточных пестицидов, тяжелых металлов и мышьяка упаковывают каждую в полиэтиленовый или многослойный бумажный пакет. К пакету прикрепляют этикетку.

Формирование аналитических проб

Из средней пробы методом квартования выделяют аналитические пробы для определения:

– внешних признаков, микроскопии, качественных реакций, измельченности и содержания примесей;

– влажности (аналитическую пробу для определения влажности отделяют сразу же после отбора средней пробы и упаковывают герметически);

– содержания золы и действующих веществ.

Масса аналитических проб должна соответствовать массе, указанной в табл. 4.

Таблица 4 – Масса аналитических проб ЛРС и ЛРП

Наименование ЛРС/ЛРП	**Масса аналитической пробы, г, для определения**		
	внешних признаков, микроскопии, качественных реакций, измельченности, примесей	**влажности**	**содержания золы и действующих веществ**
Березы почки	50	25	100
Сосны почки	200	25	100
Листья цельные, кроме нижеперечисленных:	200	25	150
сенны листья	100	15	50
толокнянки листья, брусники листья	50	25	50
листья резаные, обмолоченные, измельченные, порошок	50	25	100
Цветки цельные, измельченные, порошок, кроме нижеперечисленных:	200	25	50
полыни цитварной цветки	25	15	50
ноготков цветки, кукурузы столбики с рыльцами	100	25	50
бузины черной цветки	20	15	25
ромашки аптечной цветки	50	25	100
ромашки далматской цветки	300	25	50
Трава цельная, побеги, кроме нижеперечисленных:	300	50	200
анабазиса побеги	50	25	100
Трава, побеги резаные, обмолоченные, измельченные, порошок	50	25	100
Сочные плоды цельные, измельченные, порошок, кроме нижеперечисленных:	100	50	50
шиповника плоды, боярышника плоды	200	25	50
стручкового перца плоды	300	25	150
Сухие плоды и семена цельные, измельченные, порошок, кроме нижеперечисленных:	200	25	50

Наименование ЛРС/ЛРП	Масса аналитической пробы, г, для определения		
	внешних признаков, микроскопии, качественных реакций, измельченности, примесей	влажности	содержания золы и действующих веществ
дурмана индейского, термопсиса, семена льна, хмеля соплодия, фасоли створки плодов	50	25	100
амми плоды, джута семена	10	25	100
ольхи соплодия	100	25	100
Клубни, корни и корневища цельные, кроме нижеперечисленных:	300	50	200
марены корневища и корни, лапчатки корневища	200	50	100
салепа клубни	100	25	50
девясила корневища и корни	600	50	100
папоротника мужского корневища, ревеня корни	1000	100	300
туркестанский мыльный корень	10000	200	-
солодки корни очищенные	2000	100	200
солодки корни неочищенные, барбариса корни, элеутерококка колючего корневища и корни	5000	100	500
Корни и корневища резаные, дробленные, измельченные	100	25	100
Корни и корневища порошок	50	15	50
Кора цельная	400	50	100
Кора резаная, измельченная, порошок	100	25	50
Прочее растительное сырье:			
ликоподий	50	25	25
спорыньи рожки	50	25	100
чага цельная	2000	500	500
чага измельченная	200	25	200
ламинарии слоевища цельные	3000	500	1000
ламинарии слоевища шинкованные	500	100	300
ламинарии слоевища порошок	100	50	200
Сборы измельченные, порошок	100	25	100
Сырье животного происхождения:			
бадяга	50	25	25

Таблица 5 – Масса пробы ЛРС и ЛРП для проведения радиационного контроля

Морфологическая группа ЛРС/ЛРП	**Масса пробы не менее, г**
Листья	600
Трава	600
Цветки	600
Плоды	1000
Семена	1000
Кора	1000
Корни и корневища	1000
Почки	600
Прочее	1000

Для таких видов ЛРС, как цельная трава, корни, корневища, клубни, после выделения аналитической пробы для определения внешних признаков, измельченности и содержания примесей часть средней пробы, предназначенную для определения влажности, содержания золы и действующих веществ, измельчают ножницами или секатором на крупные куски, тщательно перемешивают и затем выделяют соответствующие аналитические пробы.

Перед формированием проб для проведения микробиологических испытаний каждой последующей партии ЛРС необходимо провести обработку применяемых инструментов и поверхности, на которой будет проводиться квартование, дезинфицирующими средствами. Если требуется измельчение, то перед измельчением каждой пробы инструмент (ножницы, секатор) также обрабатывают дезинфицирующими средствами.

Если при выделении аналитических проб в двух противоположных треугольниках масса сырья окажется меньше указанной в табл. 4, то следует из оставшихся при квартовании двух треугольников отделить сырье по всей толщине слоя и присоединить к аналитической пробе. Если масса окажется больше указанной в табл. 4, то следует удалить из отобранных треугольников

сырье по всей толщине слоя, предварительно распределив его по поверхности стола.

При установлении в результате испытаний несоответствия качества ЛРС требованиям нормативной документации следует проводить его повторную проверку. Для повторных испытаний от невскрытых транспортных единиц формируют выборку в соответствии с табл. 1 и отбирают пробы согласно настоящей ОФС. Результаты повторных испытаний являются окончательными и распространяются на всю партию.

Примечание: Статья не распространяется на отбор проб партии женьшеня корней.

Отбор проб ЛРП (серия)

ЛРП поступают в обращение в потребительских упаковках в виде цельного или измельченного ЛРС, расфасованного в пачки с внутренним пакетом и в иные подходящие виды упаковки для недозированных форм фасовки, или порошка, расфасованного в пакеты из бумаги термосвариваемой пористой неразмокаемой (фильтр-пакеты) с вложением в пачку.

Отбор проб от серии ЛРП должен быть проведен в соответствии с порядком, представленным на схеме 2.

Единицы продукции в выборку необходимо отбирать случайным образом или методом систематического отбора. Объем выборки зависит от количества транспортных единиц в серии ЛРП (согласно табл. 1).

Попавшие в выборку транспортные единицы следует вскрыть и из разных мест каждой транспортной единицы случайным образом или методом систематического отбора отобрать по 2 потребительские упаковки.

Из выборки, представленной 1-5 транспортными единицами, следует отобрать по 10 потребительских упаковок. Отобранные потребительские упаковки составляют объединённую пробу. Количество потребительских упаковок, отобранных в объединенную пробу, должно быть достаточно для проведения испытаний на соответствие требованиям нормативной

документации по меньшей мере в 2 повторностях и для формирования архивного образца.

Схема 2 – Порядок отбора проб от серии ЛРП

Содержимое потребительских упаковок средней пробы следует высыпать на гладкую, чистую, ровную поверхность, тщательно перемешать и методом квартования выделить пробы, соответствующие по массе одной из заданных проб (табл. 3, 4).

В том случае, если данного количества недостаточно, то из объединенной пробы следует выделить потребительские упаковки дополнительно.

Отклонения массы содержимого упаковки ЛРП, помещенного в пачку с внутренним пакетом, следует определять следующим образом: вскрыть пачку, взвесить внутренний пакет вместе с содержимым, затем пакет вскрыть, чтобы не были утеряны какие-либо фрагменты. Упаковку полностью очистить от содержимого при помощи щёточки. Взвесить пустую упаковку и вычислить массу содержимого упаковки путем вычитания. Взвешивание проводить с погрешностью ± 0,01. Следует повторить данные действия на 9 оставшихся упаковках и вычислить отклонение массы содержимого каждой упаковки от номинальной.

Массу содержимого упаковки ($m_{су}$) определяют по формуле:

$$m_{су} = m_{об} - m_{уп}\ , \qquad (1)$$

где $m_{об}$ – масса упаковки ЛРП вместе с содержимым, г;
$m_{уп}$ – масса упаковки ЛРП без содержимого, г.

Отклонение массы содержимого каждой упаковки (X) в процентах от номинальной вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(m_{ном} - m_{су}) \cdot 100\ \%}{m_{ном}}\ , \qquad (2)$$

где $m_{ном}$ – номинальная масса ЛРП, указанная на упаковке, г;
$m_{су}$ –масса содержимого упаковки ЛРП, г.

Допустимые отклонения приведены в табл. 6.

Таблица 6 – Допустимые отклонения массы содержимого упаковки ЛРП, помещенного в пачку с внутренним пакетом

Номинальная масса, г	**Допустимые отклонения для одной упаковки, ± %**
До 50	7,5
От 51 до 100	5
От 101 до 200	3

Для лекарственных растительных препаратов, расфасованных в фильтр-пакеты, отклонения в массе содержимого упаковки определяют по следующей методике: 10 пачек с фильтр-пакетами следует вскрыть, отобрать произвольно 20 фильтр-пакетов и определить среднюю массу содержимого одного фильтр-пакета. Для этого необходимо взвесить фильтр-пакеты вместе с содержимым, затем вскрыть, чтобы не были утеряны какие-либо фрагменты, полностью очистить упаковку от содержимого при помощи щёточки/кисточки. Взвесить пустую упаковку и вычислить массу содержимого фильтр-пакетов путем вычитания. Взвешивание следует проводить с погрешностью ± 0,01г. Вычислить среднюю массу содержимого одного фильтр-пакета и её отклонение от номинальной. Допустимое отклонение средней массы содержимого одного фильтр-пакета от номинальной ± 5%.

Требования к оборудованию при отборе проб

Для обеспечения процедуры отбора проб должны иметься в наличии все инструменты, необходимые для вскрытия упаковок, включая ножи, клещи, пилы, молотки, гаечные ключи, средства для удаления пыли (например, щетки) и материалы для повторного запечатывания упаковок (например, клейкая лента), а также самоклеящиеся этикетки, на которых следует указывать, что часть содержимого из упаковки или контейнера была извлечена.

Все инструменты и приспособления должны содержаться в чистоте. Перед повторным использованием их следует вымыть, прополоскать водой.

В качестве инструмента для отбора проб могут использоваться пробоотборники, щупы, совки и др.

Требования к персоналу, проводящему отбор проб

Требования к квалификации персонала

Сотрудник, проводящий отбор проб, должен руководствоваться в своей работе настоящими правилами. Персонал должен владеть знаниями о:

- технических приемах и оборудовании для отбора проб;
- риске перекрестной контаминации;
- подлежащих соблюдению мерах предосторожности в отношении ядовитых и сильнодействующих ЛРС и ЛРП;
- важности визуального осмотра исходного сырья, материалов, тары и этикеток;
- важности протоколирования любых непредвиденных или необычных обстоятельств.

Требования к личной гигиене персонала

При отборе проб запрещается принимать пищу, пить, курить, а также хранить еду, средства для курения в специальной одежде или месте отбора проб. Персонал, занятый отбором проб ЛРС и ЛРП, должен строго соблюдать инструкции, регламентирующие состояние здоровья и требования личной гигиены, носить технологическую одежду.

Маркировка отобранных проб

На тару с отобранной пробой сотрудник, ответственный за отбор проб, должен наклеить этикетку, содержащую следующую информацию:

- наименование ЛРС/ЛРП;
- поставщик/производитель;
- номер партии ЛРС/серии ЛРП, присвоенный на предприятии;
- номер записи в журнале регистрации отбора проб (присваивается и наносится на этикетку при поступлении образца в лабораторию);
- дата отбора пробы;

– количество отобранной пробы;

– указание, для какого вида анализа предназначена проба (заполняется при необходимости);

– Ф.И.О. и подпись сотрудника, ответственного за отбор проб.

На транспортную/упаковочную единицу, из которой отобрана проба, сотрудник, ответственный за отбор проб, должен наклеить этикетку, содержащую следующую информацию:

– «Проба отобрана»;

– дата отбора пробы;

– Ф.И.О. и подпись сотрудника, ответственного за отбор проб.

Документальное оформление отбора проб

Отбор проб для проведения контроля качества лекарственных ЛРС/ЛРП должен проводиться комиссионно. Процедура отбора должна быть задокументирована.

После проведения отбора проб составляется акт отбора, в котором указываются лица, проводившие отбор (Ф.И.О., должность), дата и место отбора проб, наименование продукции, производитель, номер серии/партии, объем поставки, количество отобранных проб (с учетом контрольного/архивного образца), срок годности/хранения. Один экземпляр акта остается в организации, в которой отбирались образцы, второй – сопровождает образец.

В журнал регистрации отбора проб заносится:

– название ЛРС/ЛРП;

– производитель/поставщик ЛРС/ЛРП;

– дата поступления ЛРС/ЛРП;

– количество транспортных единиц, из которых отобрана проба;

– дата отбора проб;

– масса отобранной пробы;

– общие замечания (включая все выявленные при внешнем осмотре несоответствия);

– Ф.И.О. лица, проводившего отбор проб.

К образцу прикладывается копия акта отбора объединенной пробы, сопроводительные документы и вспомогательная документация (сертификаты или аналитический паспорт).

Фармацевтические субстанции **ОФС.1.1.0006.15**

Фармацевтические субстанции – лекарственные средства в виде одного или нескольких обладающих фармакологической активностью действующих веществ вне зависимости от природы происхождения, предназначенные для производства, изготовления лекарственных препаратов и определяющие их эффективность.

Требования данной статьи распространяются преимущественно на фармацевтические субстанции химического и минерального происхождения. Для субстанций, представляющих собой стандартизованную смесь биологически активных веществ растительного или животного происхождения возможны отклонения от данных требований или дополнительные требования, указанные в фармакопейных статьях.

Требования данной статьи распространяются также на вспомогательные вещества, используемые при производстве/изготовлении лекарственных препаратов.

В качестве названия фармакопейной статьи на фармацевтическую субстанцию используется общепринятое название. Многие субстанции представляют собой соли органических кислот и органических оснований (например, Кеторолака трометамол, или Амлодипина бесилат, или Доксазозина мезилат), органических кислот и неорганических оснований (например, Диклофенак натрия), неорганических кислот и органических оснований (например, Кетамина гидрохлорид). Названия фармакопейных статей на такие субстанции должны включать название и катиона, и аниона.

Во вводной части фармакопейной статьи на субстанцию приводят

химическое название по номенклатуре IUPAC, структурную формулу, брутто-формулу и относительную молекулярную массу.

Вводимые показатели контроля качества и пределы нормирования должны соответствовать назначению субстанции (например, для производства/изготовления стерильных лекарственных препаратов, или стерильных неинъекционных лекарственных препаратов, или нестерильных лекарственных препаратов, или нестерильных лекарственных препаратов для местного и наружного применения и т.д.).

Испытания по показателям контроля качества фармацевтической субстанции проводят согласно соответствующим общим фармакопейным статьям (ОФС).

Описание. Указывают характеристики физического состояния и цвет субстанции. Не следует включать описание вкуса. В необходимых случаях приводят информацию о запахе, гигроскопичности и полиморфизме.

Для твердых субстанций необходимо указание формы вещества: «кристаллический», «мелкокристаллический» или «аморфный порошок». Характеристика кристалличности субстанции является одним из важных параметров, от которого зависит качество твердых дозированных лекарственных препаратов.

В некоторых случаях может быть указан численный диапазон размера частиц, а также введено исследование формы кристаллов. Такие испытания выносят в отдельные разделы.

Оценка полиморфизма субстанции обязательна в тех случаях, когда полиморфная модификация определяет фармакологическую активность лекарственного препарата и его фармако-технологические свойства.

Растворимость. Для определения растворимости следует использовать растворители, охватывающие широкую шкалу полярности, например: вода, спирт 96 %, гексан и др. Не рекомендуется использование легкокипящих и легковоспламеняющихся (например, диэтиловый эфир) или очень токсичных (например, бензол) растворителей.

Подлинность. Для установления подлинности субстанции рекомендуются физико-химические и химические методы – инфракрасная спектрометрия, абсорбционная спектрофотометрия, ЯМР-спектроскопия, тонкослойная, газовая и высокоэффективная жидкостная хроматография (ТСХ, ГХ и ВЭЖХ) и качественные (в первую очередь специфические) химические реакции. Метод ИК-спектрометрии является приоритетным при идентификации субстанций.

Температура плавления. Испытание обычно применяют для характеристики твердых веществ.

Температура затвердевания, Температура кипения (температурные пределы перегонки), Плотность, Вязкость, Показатель преломления. Данные испытания вводят для характеристики жидких субстанций.

Удельное вращение. Вводят для характеристики оптически активных веществ.

Удельный показатель поглощения. Данный показатель может являться дополнительной характеристикой подлинности и чистоты субстанции.

Прозрачность раствора, Цветность раствора. Данные испытания обязательно вводят для субстанций, используемых для приготовления парентеральных, глазных, назальных и ушных лекарственных средств. Испытание обычно проводят в водных растворах субстанции, но возможно использование органических и смешанных растворителей. Концентрация испытуемых растворов должна быть приближена к концентрации производимого/изготавливаемого из этой субстанции лекарственного препарата.

Определение цветности раствора особенно важно для оценки качества белых, почти белых или белых с оттенком субстанций.

Если субстанция окрашена, показатель «Цветность раствора» в нормативную документацию включать не следует. Это испытание, если необходимо, можно заменить регламентацией оптической плотности при

определенных длинах волн.

pH и Кислотность или Щелочность. Для проведения данного испытания могут использоваться два подхода: измерение pH или кислотно-основное индикаторное титрование (кислотность или щелочность). Испытание обычно проводят в водных растворах субстанции, но в отдельных случаях возможно использование и смешанных растворителей. Допустимый интервал pH обычно должен быть не более 2.

Концентрация испытуемого раствора при определении pH должна быть приближена к концентрации изготавливаемого из субстанции лекарственного препарата.

Родственные примеси

Данное испытание контролирует продукты деструкции фармацевтической субстанции и технологические примеси, обусловленные технологией производства. Примеси могут быть идентифицированные (соединения с установленным химическим строением) и неидентифицированные (соединения, строение которых не установлено). Пределы содержания родственных примесей в фармацевтических субстанциях приводят с учетом параметров их безопасности. Пределы контроля, идентификации и квалификации родственных примесей для фармацевтических субстанций (в зависимости от максимальной суточной дозы лекарственного препарата) приведены в табл. 1 и 2.

Таблица 1 – Пределы контроля, идентификации и квалификации родственных примесей в фармацевтических субстанциях

Максимальная суточная доза	Контролируемый предел*	Предел идентификации**	Предел квалификации***
≤ 2 г/сут	0,05 %	0,1 % или 1,0 мг/сут (что меньше)	0,15 % или 1,0 мг/сут (что меньше)
>2 г/сут	0,03 %	0,05 %	0,05 %

*предел, выше которого примесь должна контролироваться

** предел, выше которого примесь должна быть идентифицирована

***предел, выше которого должна быть установлена биологическая безопасность примеси

Приведенные пределы учитываются при нормировании родственных примесей в фармацевтических субстанциях.

Таблица 2 – Пределы контроля, идентификации и квалификации родственных примесей в пептидах, полученных синтетическим путём

Контролируемый предел	Предел идентификации	Предел квалификации
> 0,1 %	> 0,5 %	> 1,0 %

Для контроля родственных соединений обычно используют хроматографические и, реже, спектроскопические методы. Обязательно вводится идентификация и количественное определение токсичных примесей с использованием стандартных образцов**.**

Неорганические анионы (хлориды, сульфаты и др.). Выбор контролируемых анионов определяется технологией получения субстанции. При этом контролируемые анионы могут быть нетоксичными (например, хлориды, сульфаты и т.д.).

Контроль анионов не вводят, если они входят в состав субстанции (например, субстанция является гидрохлоридом или сульфатом).

Неорганические катионы (железо, медь и др.). Это испытание вводят, если контроль содержания отдельных катионов является существенным для качества субстанции; их содержание должно быть обосновано.

Контроль катионов не вводят, если они входят в состав субстанции (например, вещество является натриевой солью).

Потеря в массе при высушивании или Вода. Испытание вводят для контроля содержания летучих веществ и/или влаги в субстанции. Введение одного из этих испытаний, как правило, обязательно. Отсутствие их должно быть обосновано. Если нет других указаний в фармакопейной статье и субстанция не является кристаллогидратом (кристаллосольватом), потеря в массе при высушивании или содержание воды, как правило, не должно

превышать 0,5 %. Результаты определения по этим показателям учитывают при оценке результатов количественного определения.

Если субстанция является кристаллогидратом (кристаллосольватом), регламентируют верхний и нижний пределы.

Сульфатная зола. Как правило, сульфатная зола не должна превышать 0,1 %. Отсутствие этого испытания в фармакопейной статье или повышенное содержание сульфатной золы требует соответствующего обоснования.

Тяжелые металлы. Устанавливаемые пределы содержания тяжелых металлов в фармацевтических субстанциях определяются максимальной суточной дозой препарата, произведенного из данной субстанции, и длительностью его возможного применения (согласно Инструкции по медицинскому применению) (табл. 3).

Мышьяк. Данное испытание вводят в том случае, когда или исходное сырье может содержать мышьяк, например, для сырья природного происхождения, или возможно загрязнение им в процессе получения субстанции. Содержание мышьяка, как правило, не должно превышать 0,0001 %.

Таблица 3 – Критерии для нормирования допустимого содержания тяжелых металлов

Суточная доза, г/день	Длительность лечения, дни	Введение показателя «Тяжелые металлы» и устанавливаемый предел, ppm
> 0,5	< 30	Вводится показатель «Тяжелые металлы», предел - 20
> 0,5	> 30	Вводится показатель «Тяжелые металлы», предел - 10
< 0,5	> 30	Вводится показатель «Тяжелые металлы». Если субстанция предназначена для производства парентеральных препаратов, то предел - 10, в других случаях - 20.
< 0,5	< 30	Показатель «Тяжелые металлы» не вводится

Остаточные органические растворители. В фармацевтических субстанциях определяют остаточные количества органических растворителей 1 касса токсичности, если обосновано их применение, независимо от стадии, на которой они используются.

Для растворителей 2 класса токсичности, используемых не на последней стадии производства фармацевтических субстанций, в нормативной документации должен быть предусмотрен контроль их остаточного содержания, либо должно быть приведено обоснование отсутствия контроля их остаточного содержания; если растворители 2 класса токсичности используются на последней стадии, каждый из них должен быть определен количественно.

В фармацевтических субстанциях контроль растворителей 3 класса токсичности необходим, если они используются на последней стадии производства. Для определения остаточных количеств растворителей 3 класса токсичности, если их содержание не превышает 0,5 %, допускается применение неспецифического метода «Потеря в массе при высушивании»; при наличии растворителей 3 класса, если их содержание превышает 0,5 %, каждый из них должен быть определен количественно.

Испытания на бактериальные эндотоксины, пирогенность, аномальную токсичность, гистамин и/или депрессорные вещества не распространяются на вспомогательные вещества.

Бактериальные эндотоксины или Пирогенность. Данные испытания проводят для субстанций, предназначенных для приготовления лекарственных форм для парентерального применения. Субстанции должны выдерживать тест на бактериальные эндотоксины или пирогенность без проведения предварительной стерилизации.

Если доказано, что субстанция не обладает пирогенными свойствами и в процессе производства не может быть загрязнена пирогенными примесями не бактериальной природы, то следует проводить испытание на «Бактериальные эндотоксины».

Включение показателей «Пирогенность» и «Бактериальные эндотоксины» на альтернативной основе нецелесообразно ввиду различной чувствительности методов.

Аномальная токсичность

Испытанию на аномальную токсичность подлежат субстанции, получаемые из крови, органов, тканей человека или животного, растительного сырья, микроорганизмов и продуктов их жизнедеятельности, предназначенные для производства лекарственных препаратов для парентерального применения.

Гистамин и/или Депрессорные вещества

Испытанию на гистамин и депрессорные вещества подлежат субстанции, которые используются для приготовления лекарственных препаратов, предназначенных только для внутрисосудистого введения, и если в их составе могут быть изначально или приобретаются в процессе производства примеси, обладающие депрессорным действием (субстанции микробиологического или животного происхождения).

Микробиологическая чистота. Уровень микробиологической чистоты субстанции должен обеспечивать уровень чистоты лекарственного препарата при его производстве/изготовлении из этой субстанции.

Стерильность. Данное испытание вводят для субстанций, используемых в производстве готовых стерильных лекарственных средств, которые не подвергаются процедуре стерилизации.

Количественное определение. Для количественного определения действующего вещества субстанции используют физико-химические и химические методы анализа.

Физико-химические и химические методы анализа для определения содержания действующего вещества в субстанции следует применять в сочетании с современными физико-химическими методами анализа, используемыми для идентификации субстанции и контроля примесей (ИК-

спектрофотометрия, ВЭЖХ, ГХ и др.).

В случае солей обычно достаточно анализа только одного из ионов – предпочтительно фармакологически активного.

Содержание действующего вещества дается в пересчете на сухое вещество, если определяется потеря в массе при высушивании, в пересчете на безводное вещество, если определяется вода, в пересчете на безводное и свободное от остаточных органических растворителей вещество, если определяется вода» и остаточные органические растворители.

Упаковка и хранение. Упаковка и условия хранения должны обеспечивать качество субстанции в течение установленного срока годности.

Маркировка. Должна включать торговое и международное непатентованное наименование, информацию о назначении субстанции, наименование производителя, количество, условия хранения, меры предосторожности (при необходимости), дату изготовления, номер серии, срок годности и условия хранения.

Срок годности. Срок годности субстанций определяется временем, в течение которого она соответствует требованиям нормативной документации. Срок годности субстанции может быть установлен хранением при обычных условиях или методом «ускоренного старения» при повышенной температуре.

Стандартные образцы. Современные методы анализа предусматривают использование стандартных образцов. В качестве стандартных образцов при анализе фармацевтических субстанций следует использовать фармакопейные стандартные образцы, аттестованные уполномоченным фармакопейным органом. При их отсутствии для идентификации и оценки содержания действующего вещества должны использоваться первичные стандартные образцы.

Стандартные образцы **ОФС.1.1.0007.18**

Взамен ст. ГФ XI, вып.2

Настоящая общая фармакопейная статья определяет основные требования и положения, предъявляемые к стандартным образцам (СО), которые могут применяться для оценки качества лекарственных средств (ЛС), включая биологические лекарственные средства (БЛС), и тем самым являться неотъемлемой частью фармакопейной статьи (ФС) или нормативной документации (НД).

Настоящая общая фармакопейная статья не распространяется на стандартные образцы генотерапевтических лекарственных средств и радиофармацевтических препаратов.

Цель использования СО в фармакопейном анализе – достижение надлежащего уровня контроля качества субстанций для фармацевтического применения и лекарственных препаратов. В рамках фармакопейной статьи могут использоваться только фармакопейные стандартные образцы (ФСО).

СО не предназначены для использования в качестве лекарственных средств.

ОСНОВНЫЕ ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Стандартные образцы (СО) - вещества, посредством сравнения с которыми осуществляется контроль качества исследуемых лекарственных средств с помощью физико-химических и биологических методов в целях подтверждения соответствия лекарственных средств требованиям нормативной документации, установленным при осуществлении государственной регистрации, и которые применяются для калибровки стандартных образцов производителя лекарственных средств, используемых

для контроля качества и иных целей при обращении лекарственных средств;

Фармакопейный стандартный образец (ФСО) - стандартный образец, произведенный в соответствии с фармакопейной статьей (ФС).

Стандартный материал - материал или вещество, обладающий однородностью по одному или несколькими свойствам, которые аттестованы для определения количественных показателей качества материала, при оценке методики измерения или калибровке прибора.

Аттестация стандартных образцов – исследование, направленное на установление значений аттестованных характеристик в соответствии с программой и/или методикой испытаний, с последующим оформлением надлежащих документов (паспорт, инструкция по применению СО, макетов этикетки первичной и вторичной упаковки). Аттестация СО предполагает проведение испытаний по исследованию однородности, стабильности, определению аттестованного значения и границ его погрешности или неопределенности, определению оптимальных условий хранения и транспортировки.

Аттестуемая характеристика стандартных образцов - величина или зависимость 2 величин, характеризующая состав или свойства действующего вещества, примесей, вспомогательных веществ, аттестованное значение которых с указанием неопределенности устанавливают при аттестации СО, и приводят в паспорте на СО. Большинство СО имеют несколько аттестуемых характеристик.

Аттестованное значение стандартных образцов - значение аттестуемой характеристики СО, установленное при его аттестации и приводимое в паспорте и других документах на СО с указанием его погрешности или неопределенности. Аттестованное значение представляют числом, выражающим значение воспроизводимой СО величины в установленных единицах.

Однородность стандартных образцов - свойство СО, выражающееся в постоянстве значения аттестуемой характеристики СО, присущего любой

части СО, используемой при его применении согласно назначению (т.е. идентичность содержимого каждой упаковки данной серии СО по составу, количеству, активности и стабильности содержимому всех остальных упаковок данной серии СО).

Неопределенность аттестованного значения – как правило, оценивают по стандартному отклонению аттестованного значения с определенным коэффициентом охвата или границы интервала аттестованного значения при определенном коэффициенте охвата.

Так как оценка систематической ошибки биологических методов затруднена, вследствие невозможности установления истинного значения измеряемой величины, неопределенность методики может быть оценена по результатам межлабораторного эксперимента в рамках ее валидации, проведенной в условиях воспроизводимости. Для международных СО аттестованное значение может быть приведено без указания неопределенности.

Погрешность аттестованного значения стандартных образцов - отклонение аттестованного значения от истинного значения аттестуемой характеристики экземпляра СО (при его наличии), а также любой его части (доли, навески), используемой для измерений.

Погрешность от неоднородности СО - погрешность аттестованного значения СО, обусловленная отклонением значений аттестуемой характеристики СО в любой наименьшей представительной пробе СО от его аттестованного значения.

Дополнительные характеристики стандартных образцов - значения величин, характеризующих состав или свойства СО, приводимые без указания их погрешностей или неопределенности в паспорте и других документах на СО. Дополнительные характеристики СО используются при установлении ограничений по применению СО для конкретных целей.

Стабильность стандартных образцов – свойство СО, выражающееся в неизменности значений аттестованной характеристики СО во времени при

соблюдении условий хранения, транспортирования и применения.

Срок годности стандартных образцов - интервал времени, исчисляемый с даты выпуска серии СО, в течение которого гарантируется соответствие аттестованных характеристик СО характеристикам, указанным в его паспорте.

Программа аттестации стандартных образцов - раздел технической документации на СО, устанавливающий объем, виды и последовательность выполнения работ по аттестации СО, место и сроки их проведения, форму представления отчетных данных.

Методика аттестации стандартных образцов - раздел технической документации на СО, устанавливающий перечень определяемых характеристик СО, методы, средства и алгоритмы измерений, способы обработки результатов измерений и форму их представления. Программу и методику аттестации СО допускается объединять в 1 документ.

Признание (утверждение) стандартных образцов - решение уполномоченного органа о соответствии СО требованиям, распространяющегося на него нормативного документа и допуска его к применению в соответствии с назначением.

Межлабораторная аттестация стандартных образцов - аттестация СО, основанная на использовании результатов измерений, выполненных независимо в нескольких лабораториях с применением одного или нескольких методов измерений.

Классификация

В зависимости от процедуры аттестации стандартные образцы могут быть первичными и вторичными. Кроме того, различают стандартные образцы следующих категорий: международные, межгосударственные (региональные), государственные, фармакопейные, отраслевые СО, а также СО предприятий.

Первичный стандартный образец - стандартный образец, обладающий

необходимыми свойствами для целенаправленного использования, аттестация которого осуществляется без сравнения с существующими стандартными образцами.

Вторичный стандартный образец - стандартный образец, аттестованный в результате сравнения с первичным стандартным образцом.

Международный стандартный образец - стандартный образец, активность которого выражена в международных единицах. Эквивалентность международных единиц (МЕ) международного стандартного образца утверждена Всемирной Организацией Здравоохранения (ВОЗ).

Меж государст венный (региональный) стандартный образец – стандартный образец, признанный в рамках Европейского союза или Евроазиатского экономического союза в соответствии с установленными правилами и применяемый в государствах, присоединившихся к его признанию.

Стандартный образец предприятия – стандартный образец, утвержденный в установленном порядке и применяемый в соответствии с нормативными документами предприятия, аттестуется в установленном порядке с использованием международных или фармакопейных стандартных образцов и является, как правило, вторичным стандартным образцом. В исключительных случаях для новых лекарственных средств при отсутствии международных СО ВОЗ или фармакопейных СО эти образцы могут являться первичными СО.

СО подразделяются на химические, биологические и растительные в зависимости от природы вещества/веществ, входящих в их состав.

Химический стандартный образец. Вещество или смесь веществ, химического происхождения, которые предназначены для использования в соответствии с указаниями ФС или НД, а также отдельных общих фармакопейных статей (ОФС). Содержание субстанции в химическом СО выражается в процентах, за некоторым исключением (как правило, антибиотики), когда количественное содержание выражено в МЕ. В

последнем случае СО являются вторичными, аттестованными по международным СО.

Биологический стандартный образец (препарат). Вещество или смесь веществ биологической природы, которые предназначены для использования в соответствии с указаниями ФС или НД, а также отдельных ОФС. Биологические СО являются либо первичными СО, либо вторичными, аттестованными по Международным СО. Их активность, как правило, выражается в МЕ. Могут быть использованы также другие присвоенные значения, например, титр вирусов, или число бактерий.

Растительный стандартный образец. Вещество или смесь веществ растительного происхождения. Для лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов в качестве стандартных образцов могут быть использованы биологически активные вещества растений (вещества с известной фармакологической активностью), вещества-маркеры активные и/или неактивные (химические вещества, используемые для идентификации и/или количественного определения основных веществ), а также стандартизованное лекарственное растительное сырье или экстракты. Последние должны быть охарактеризованы с использованием стандартных образцов биологически активных веществ или веществ-маркеров.

При оценке фармацевтической субстанции или лекарственного препарата различного происхождения на его соответствие требованиям ФС и/или НД используются как стандартные образцы веществ или препаратов, так и стандартные образцы возможных примесей.

Для установления подлинности лекарственных средств наряду со СО могут быть использованы эталонные ИК-спектры, приведенные в Государственной фармакопее РФ.

ОСОБЕННОСТИ ПРОИЗВОДСТВА СТАНДАРТНЫХ ОБРАЗЦОВ

Стандартные образцы фармацевтических субстанций могут быть получены прямым синтезом и/или доочисткой фармацевтических субстанций

до требуемой степени чистоты.

Стандартные образцы примесей могут быть получены либо прямым синтезом, либо выделением из фармацевтических субстанций, либо в процессе их получения.

Стандартные образцы биологического происхождения, как правило, представляют собой аттестованные серии препаратов биологического происхождения.

Производство стандартных образцов (в частности, биологических СО) должно осуществляться в соответствующих по классу чистоты помещениях с использованием аттестованного оборудования и валидированного процесса производства, обеспечивающего постоянство регламентированного качества материала СО.

Количество изготовленных единиц стандартных образцов, входящих в серию, должно обеспечивать не только возможность проведения аттестации СО и его дальнейшее применение по прямому назначению, но и возможность проведения мониторинга стабильности.

Содержимое всей упаковки конкретной серии должно быть идентичным по составу, количеству, активности и стабильности, все СО должны быть получены при фасовке одного и того же однородного исходного материала и обработаны в одинаковых условиях за один производственный цикл.

Стеклянные упаковки (ампулы или флаконы) должны быть изготовлены из нейтрального стекла, при этом в стекле не должно быть внутренних напряжений. Стекло должно выдерживать стерилизацию нагреванием и перепады температуры (например, быстрое охлаждение до минус 80 ^{o}C или ниже), если эти процедуры предусмотрены при производстве СО. Толщина стенок стеклянной упаковки должна быть не менее 0,5 мм для предотвращения проникновения газов.

При использовании пластиковых упаковок (пробирок, флаконов), их пригодность должна быть подтверждена экспериментально.

При наличии в процессе производства СО стадии лиофилизации используются упаковки только с ровным плоским дном (для обеспечения равномерной теплопроводности между дном упаковки и поверхностью полки).

Очистку упаковки в случае необходимости проводят различными методами. При использовании автоклавирования пар, поступающий в автоклав, не должен содержать никаких летучих или нелетучих примесей.

При осуществлении фасовки СО методом розлива для определения полученной массы следует отбирать образцы в начале, середине и конце розлива. Колебания массы при розливе, характеризуемые коэффициентом вариации, должны составлять не более 1%.

Используемые противомикробные консерванты не должны воздействовать на действующее вещество в процессе лиофилизации или влиять на его стабильность в течение срока годности.

Используемые вспомогательные вещества (наполнители) не должны влиять на результаты испытаний или тестов, для которых СО предназначен, или оказывать неблагоприятное воздействие на его активность.

Для лиофилизированных стандартных образцов должны быть установлены оптимальные условия замораживания (температура, скорость замораживания) и режим лиофилизации.

Ампулы запаивают под вакуумом или после заполнения инертным газом, например, азотом или аргоном (газ должен быть свободен от кислорода). Наличие вакуума или содержание остаточного кислорода подлежит контролю. До заполнения ампулы должны как можно меньше подвергаться воздействию атмосферного воздуха и быть защищены от действия света и влаги.

Процесс производства стандартных образцов должен быть документирован.

ПРИМЕНЕНИЕ СТАНДАРТНЫХ ОБРАЗЦОВ

Стандартные образцы применяют при анализе фармацевтических субстанций и лекарственных препаратов в испытаниях на подлинность, чистоту и количественное определение.

Биологические стандартные образцы также могут использоваться для определения валидационных характеристик диагностических наборов для выявления маркеров/возбудителей инфекционных заболеваний.

Каждый стандартный образец имеет определенную область применения и не может быть использован в других целях. Например, вторичный СО используется для тех же целей, что и первичный СО, согласно которого он был аттестован.

Требования к чистоте стандартного образца зависят от его предполагаемого использования.

В зависимости от поставленных задач могут быть использованы СО различных категорий: первичные СО (международные СО, СО отечественной и зарубежных фармакопей (ФСО), государственные СО), вторичные СО и химические вещества требуемой степени чистоты (для определения примесей − посторонних примесей, органических растворителей, оценки пригодности хроматографической системы и др.).

Для установления подлинности ЛС наряду со СО могут быть использованы эталонные ИК-спектры, приведенные в Государственной фармакопее РФ.

АТТЕСТАЦИЯ СТАНДАРТНЫХ ОБРАЗЦОВ

Первичный стандартный образец

При проведении аттестации первичного стандартного образца используют различные взаимодополняющие методы анализа.

Основные разделы испытаний

– Описание вещества (структурное описание) - осуществляется с помощью подходящих химических характеристик, таких как: структурная формула,

эмпирическая формула и молекулярная масса. При этом могут быть использованы различные методы, включая:

- спектрометрию ядерного магнитного резонанса;
- масс-спектрометрию;
- инфракрасную спектрометрию;
- элементный анализ.

– Определение чистоты вкючает:
  - определение содержания органических примесей подходящим методом разделения или спектрофотометрическим методом;
  - определение содержания воды;
  - определение содержания остаточных растворителей;
  - определение потери в массе при высушивании, которое может в некоторых случаях заменить определение воды и остаточных растворителей;
  - определение неорганических примесей (тяжелые металлы, сульфатная зола и др.) проводится с использованием спектрометрии индуктивно связанной плазмы, атомной спектрометрии, рентгеновской флуоресценции; результаты не используются при количественном определении устанавливаемого содержания основного компонента, за исключением значительного влияния на это содержание;
  - определение чистоты абсолютным методом, например, дифференциальная сканирующая калориметрия или фазовая растворимость; результаты этих определений используется для подтверждения результатов, полученных с использованием методов разделения; они не используются при количественном определении устанавливаемого содержания основного компонента).
– Количественное определение. Содержание основного компонента обычно рассчитывают, исходя из значений, полученных при определении

примесей (органические примеси, неорганические примеси, вода и остаточные растворители), используя принцип материального баланса; могут применяться и другие пригодные методы.

Для биологических стандартных образцов подлинность, чистота подтверждается различными взаимодополняющими физико-химическими, иммунохимическими методами анализа (ЯМР-спектроскопия, масс-спектрометрия, ИФА, ВЭЖХ, электрофоретические и другие), а биологическая (специфическая) активность и количественное определение – биологическими, иммунохимическими, физико-химическими методами.

Для стандартных образцов, используемых только в качественных методах, количественное содержание возможно не указывать.

Отчет об аттестации стандартных образцов утверждается в установленном порядке

ФАРМАКОПЕЙНЫЕ СТАНДАРТНЫЕ ОБРАЗЦЫ

Кандидаты в фармакопейные стандартные образцы испытываются с помощью различных аналитических методов. Объем испытаний и количество участвующих лабораторий зависит от используемого СО. Обычно требуется соответствие кандидата требованиям соответствующей фармакопейной статьи или ОФС Государственной фармакопеи РФ, другие подходы должны быть обоснованы.

При проведении межлабораторных испытаний СО протокол испытаний направляется каждому участнику.

Фармакопейный стандартный образец**,** аттестуют с использованием различных аналитических методов, выбранных для подтверждения его пригодности для данного использования, включенных в разработанный нормативный документ.

Объем проводимых исследований и требования к чистоте СО зависят от его предполагаемого использования.

Фармакопейный стандартный образец для установления подлинности

не требует высокой степени очистки. Для испытания на подлинность (ИК- и УФ-спектрофотометрия, хроматография) можно использовать субстанцию, полная характеристика структуры которой установлена на первой серии, произведенной согласно технологическому регламенту и соответствующей требованиям нормативного документа, без дополнительной очистки.

Если фармакопейный стандартный образец производится впервые, необходимо подтвердить его структуру различными взаимодополняющими химическими и физико-химическими методами анализа, такими как элементный анализ, ИК- и ЯМР-спекроскопия, масс-спектрометрия. Для ФСО, используемых для установления подлинности, количественное содержание не указывают.

У биологических фармакопейных стандартных образцов, предназначенных для испытания на подлинность, структура подтверждается различными взаимодополняющими физико-химическими, иммунохимическими методами анализа (ЯМР-спектроскопия, масс-спектрометрия, ИФА и другие), а биологическая (специфическая) активность – биологическими и иммунохимическими методами.

Фармакопейные стандартные образцы для испытания на чистоту и посторонние примеси

Оценка качества ФСО, используемого для определения специфической примеси, проводится по установлению подлинности и чистоты. ФСО для испытаний на посторонние примеси может представлять собой синтезированную или специально выделенную и очищенную примесь. При количественном содержании основного вещества от 95 % и выше его принимаю за 100 %. При содержании основного вещества менее 95 % в расчетах необходимо учитывать значение фактического содержания.

Если примесь не может быть получена в достаточном количестве, возможны следующие варианты:

- подготовка стандартного образца, содержащего смесь основного

соединения(ий) и примеси или примесей;

- подготовка стандартного образца, содержащего смесь указанных примесей.

Содержание примеси в таком стандартном образце определяют соответствующими валидированными методами разделения.

У биологических фармакопейных стандартных образцов, предназначенных для испытания на чистоту количественное определение проводят различными взаимодополняющими физико-химическими методами анализа, устанавливая аттестованное значение для каждого используемого метода.

Фармакопейные стандартные образцы для количественного анализа. Оценку качества ФСО, предназначенного для количественного определения физико-химическими методами, осуществляют различными методами.

Для определения количественного содержания действующего вещества в ФСО рекомендуется использовать метод, основанный на материальном балансе: сумма всех определенных в ФСО веществ: основное вещество, вода и летучие растворители, минеральные и нелетучие органические примеси, – должна составлять 100 %.

При вычислении результатов количественного определения, полученных с использованием ФСО, учитывают фактическое содержание основного вещества в ФСО.

Содержание для ФСО может приводиться в пересчете на действующую часть молекулы в соответствии с требованиями содержания действующего вещества лекарственного препарата.

Если ФСО предназначен для использования не для хроматографического метода количественного определения (например, фотометрия или спектрофотометрия в ультрафиолетовой области), необходимо убедиться в отсутствии значимого поглощения примеси(ей) при выбранной длине волны.

В случае использования селективного метода определяют количество примесей максимально возможными методами анализа.

Для ФСО, приготовленных в процессе лиофилизации, обычно содержание указывают в миллиграммах или МЕ на упаковку, поскольку затем ее содержимое извлекают количественно.

Как правило (если нет других указаний в маркировке), для ФСО, в отличие от фармацевтической субстанции, обычно не используется пересчет на безводное или сухое вещество – присвоенное значение содержания указывают «как есть».

В некоторых случаях ФСО необходимо высушивать перед использованием (не в оригинальной упаковке), и тогда содержание указывают в расчете на высушенную субстанцию. При этом в сопроводительной документации указывают условия высушивания и время, в течение которого достигается постоянство массы.

Биологические ФСО для количественного определения биологическим методом аттестуют по международному стандартному образцу и выражают активность в условных международных единицах (МЕ) или мкг/мг, единицах тканевой цитопатогенной дозы (ТИЦД), 50% летальной дозы (LD_{50}), минимальной иммунизирующей дозы (МИД). В случае отсутствия международного стандартного образца, используются значения аттестуемой характеристики биологических ФСО для оценки специфической активности, например, бляшкообразующие единицы (БОЕ), колониеобразующие единицы (КОЕ), титр вируса и др. Аттестованное значение активности рассчитывается по результатам межлабораторных испытаний. Используются различные критерии валидности результатов, включая параллелизм, линейность и квадратичное отклонение в соответствии со стандартными статистическими процедурами. Аттестованное значение биологической активности и ее неопределенности рассчитывается из статистически валидных результатов.

Испытания для ФСО, используемых в ФС на лекарственное средство растительного происхождения, зависят от типа ФСО:

− активный компонент или входящее в состав вещество-маркер (активное и/или неактивное) характеризуют испытаниями на подлинность, чистоту и содержание;

− количественное содержание для стандартного растительного сырья или экстракта устанавливают с использованием стандартного образца активного компонента или вещества-маркера.

ВТОРИЧНЫЕ СТАНДАРТНЫЕ ОБРАЗЦЫ

Вторичный СО должен иметь такие же свойства, что и первичный СО, сравнением с которым утверждают вторичный СО.

Стандартные образцы для установления подлинности. Для использования в ИК-спектрометрии: полосы поглощения должны соответствовать по положению и относительной величине полосам поглощения первичного СО. Для использования в методах разделения (хроматография, электрофорез): расстояние миграции/время миграции/ время удерживания вторичного СО должны быть такими же, как для первичного СО.

Стандартные образцы для испытания на посторонние примеси. Для использования в методах хроматографического разделения – то же, что и для идентификации.

Стандартные образцы для количественного анализа. Для вторичного СО проводят количественное определение относительно первичного СО с присвоенным значением количественного содержания или активности. Присвоенное значение характеристики вторичного СО должно быть близким соответствующему значению первичного СО, с которым проводят сравнение. Предварительно в протоколе аттестации определяют количество независимых повторных испытаний и используемые критерии приемлемости.

Отчет по аттестации стандартных образцов должен содержать все необходимые сведения для его утверждения (отчет для СО,

предназначенного для количественного определения, включает материалы по установлению аттестованного значения и его неопределенности).

В отчет об аттестации СО включают полные сведения (все первичные данные) о выполненной работе, необходимые для экспертной оценки и метрологической экспертизы представленных материалов, в том числе:

- обоснование необходимости разработки и назначение СО;
- описание технологии получения СО или ссылка на соответствующий документ;
- методика аттестации с указанием средств измерений и их погрешности, последовательности операций, экспериментальных данных, алгоритма и результатов статистической обработки данных по установлению аттестуемых характеристик СО;
- описание процедуры и экспериментальные данные по исследованию стабильности и однородности СО;
- копии документов, подтверждающих поверку средств измерений, материалы по валидации используемых методов; проект паспорта на СО, макеты этикеток СО, инструкция по безопасному применению СО.

УПАКОВКА СТАНДАРТНЫХ ОБРАЗЦОВ, ФАРМАКОПЕЙНЫХ СТАНДАРТНЫХ ОБРАЗЦОВ

Упаковка стандартных образцов должна обеспечивать его стабильность в течение срока годности и быть удобной для использования.

Твердые вещества расфасовывают в индивидуальные упаковки (предпочтительно флаконы), жидкости − обычно в запаиваемые ампулы.

Для лабильных веществ необходим полномасштабный контроль за условиями внешней среды (освещение, влажность, температура).

МАРКИРОВКА СТАНДАРТНЫХ ОБРАЗЦОВ, ФАРМАКОПЕЙНЫХ СТАНДАРТНЫХ ОБРАЗЦОВ

Вся информация, необходимая для правильного использования стандартного образца, приводится на упаковке, во вкладыше или

сопроводительной документации.

На этикетке упаковки стандартного образца, фармакопейного стандартного образца указывают:

Название СО, ФСО.

Количество СО, ФСО, в миллиграммах (или в миллилитрах).

Активность или процентное содержание. При отсутствии этого указания стандартный образец принимают за 100,0 %.

Номер серии.

Условия хранения.

Указания по использованию: «Для количественного определения», «Для идентификации методом ИК-спектрометрии», «Для определения посторонних примесей», «Перед использованием определить содержание воды», «Перед использованием высушить» и др.

Дата выпуска.

Срок годности.

Предупредительные надписи (при необходимости).

Условия хранения и транспортирования, указания по использованию, предупредительные надписи, а также необходимые методики могут быть приведены в прилагаемой сопроводительной документации.

При отсутствии указаний об условиях высушивания, стандартный образец следует использовать в том виде, в котором он получен.

ХРАНЕНИЕ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ СТАНДАРТНЫХ ОБРАЗЦОВ, ФАРМАКОПЕЙНЫХ СТАНДАРТНЫХ ОБРАЗЦОВ

Условия хранения и транспортирования СО устанавливают на основе результатов исследования стабильности СО.

Для большинства ФСО оптимальным является хранение в защищенном от света месте при температуре (5±3) °С в упаковках, предохраняющих образцы от проникновения влаги; при этом следует избегать помещений с повышенной влажностью.

Если требуются специальные условия хранения, они должны быть

указаны на этикетке, паспорте на СО и инструкции по использованию СО.

Невскрытая упаковка со СО хранится в рекомендуемых условиях и используется сразу после вскрытия (если не указаны иные условия хранения).

ИССЛЕДОВАНИЕ СТАБИЛЬНОСТИ СТАНДАРТНЫХ ОБРАЗЦОВ

Для гарантии длительной пригодности следует периодически проверять стандартные образцы на сохранность в процессе хранения. Проводят исследования любых признаков разложения соответствующими методами.

Периодичность и объем проводимых испытаний зависят от физико-химических свойств образца (физического состояния, стабильности, гигроскопичности), упаковки, условий хранения и области применения.

Целесообразно проводить следующие испытания:

- определение воды, потеря в массе при высушивании и/или термогравиметрический анализ;

– определение продуктов распада методами разделения;

– другие специфичные испытания для обнаружения продуктов распада.

Срок годности биологических СО устанавливают на основе результатов исследований стабильности СО методом естественного старения. Если в качестве материала СО используется лекарственное средство, внесенное в Государственный реестр лекарственных средств РФ, стабильность которого в течение определенного срока (срока годности) определена, то срок годности СО устанавливают равным сроку годности ЛС.

Следует проводить мониторинг стабильности СО в процессе хранения. Периодичность и объем проводимых испытаний зависят от свойств образца (физическое состояние, физико-химические и биологические свойства, стабильности, гигроскопичности), упаковки, условий хранения и области применения.

Остаточные органические растворители	**ОФС.1.1.0008.15** **Взамен ГФ XII, ч.1,ОФС 42-0057-07**

Остаточные органические растворители – летучие растворители, которые используются или образуются на любой стадии производства фармацевтических субстанций, вспомогательных веществ или лекарственного препарата и полностью не удаляются после завершения технологического процесса.

Контролю на содержание органических растворителей подлежат фармацевтические субстанции и вспомогательные вещества, а также лекарственные препараты независимо от способа применения, если при их получении или очистке используются органические растворители, или они могут образоваться в процессе производства.

Нормативная документация, регламентирующая качество таких фармацевтических субстанций и вспомогательных веществ, а также лекарственных препаратов, должна иметь раздел «Остаточные органические растворители».

Отсутствие данного раздела в нормативной документации должно быть обосновано.

Предельно допустимое содержание органических растворителей в лекарственных средствах определяется степенью их возможного риска для здоровья человека. Эти факторы положены в основу классификации органических растворителей:

1 класс – высокотоксичные растворители (генотоксичные канцерогены), применяемые в фармацевтическом производстве в исключительных случаях, когда нельзя отказаться от их использования (табл. 1);

2 класс – негенотоксичные растворители. Нормирование их в лекарственных средствах обусловлено максимально допустимым количеством, принимаемым в составе суточной дозы лекарственного средства (табл. 2);

3 класс – растворители низкой токсичности, содержание которых до 0,5 % не требует подтверждения (табл. 3). Содержание таких растворителей допускается и в более высоких пределах, если это регламентировано правилами Надлежащей производственной практики или иными стандартами производства.

Определение содержания остаточных органических растворителей может быть осуществлено различными валидированными методиками. Наиболее часто для этих целей используется метод газовой хроматографии.

Содержание остаточных органических растворителей в лекарственных средствах регламентируется следующим образом:

1) при наличии растворителей 1 класса каждый из них должен быть идентифицирован и определен количественно;

2) при наличии растворителей 2 класса каждый из них должен быть идентифицирован и определен количественно;

3) при наличии растворителей 3 класса, если их суммарное содержание не превышает 0,5 %, для определения допускается применение неспецифического метода «Потеря в массе при высушивании»; если их содержание превышает 0,5 %, каждый из них должен быть идентифицирован и определен количественно. Предельно допустимое содержание в лекарственных средствах остаточных органических растворителей 3 класса токсичности составляет 50 мг/сут.

Условия проведения анализа на остаточные органические растворители должны быть описаны в соответствующей нормативной документации.

Указание на необходимость определения в фармацевтической субстанции или готовой лекарственной форме иных органических растворителей и условия проведения их анализа должны содержаться в

соответствующей нормативной документации.

Таблица 1 – Предельно допустимое содержание в лекарственных средствах остаточных органических растворителей 1 класса токсичности

Растворитель	**Предельное содержание, ppm**
Бензол	2
1,1-Дихлорэтен	8
1,2-Дихлорэтан	5
1,1,1-Трихлорэтан	1500
Четыреххлористый углерод	4

Таблица 2 – Предельно допустимое содержание в лекарственных средствах остаточных органических растворителей 2 класса токсичности

Растворитель	**Предельное содержание, мг/сут**	**Предельное содержание, ppm**
Ацетонитрил	4,1	410
Гексан	2,9	290
N,N-Диметилацетамид	10,9	1090
N,N-Диметилформамид	8,8	880
1,2-Диметоксиэтан	1,0	100
1,4-Диоксан	3,8	380
1,2-Дихлорэтен	18,7	1870
Ксилол	21,7	2170
Кумол	0,7	70
Метанол	30,0	3000
Метилбутилкетон	0,5	50
Метиленхлорид	6,0	600
N-Метилпирролидон	5,3	530
Метилциклогексан	11,8	1180
2-Метоксиэтанол	0,5	50
Нитрометан	0,5	50
Пиридин	2,0	200

Сульфолан	1,6	160
Тетрагидрофуран	7,2	720
Тетралин	1,0	100
Толуол	8,9	890
Трихлорэтен	0,8	80
Формамид	2,2	220
Хлорбензол	3,6	360
Хлороформ	0,6	60
Циклогексан	38,8	3880
Этиленгликоль	6,2	620
2-Этоксиэтанол	1,6	160

Таблица 3 – Растворители 3 класса токсичности, которые подлежат нормированию в соответствии с требованиями настоящей ОФС

Ацетон	3-Метил-1-бутанол
Анизол	Метилизобутилкетон
1-Бутанол	2-Метил-1-пропанол
2-Бутанол	Метилэтилкетон
Бутилацетат	Пентан
трет-Бутилметиловый эфир	1-Пентанол
Гептан	1-Пропанол
Диметилсульфоксид	2-Пропанол
Диэтиловый эфир	Пропилацетат
Изобутилацетат	Уксусная кислота
Изопропилацетат	Этанол
Муравьиная кислота	Этилформиат
Метилацетат	

Нет достоверных сведений о возможном риске для здоровья человека следующей группы растворителей (табл. 4). Тем не менее, в случае использования этих растворителей производитель должен обосновать их остаточное содержание.

Таблица 4 – Растворители с недостаточно обоснованной токсичностью

1,1-Диэтоксипропан	Метилизопропилкетон
1,1-Диметоксиметан	Метилтетрагидрофуран
2,2-Диметоксипропан	Петролейный эфир
Изооктан	Трихлоруксусная кислота
Изопропиловый эфир	Трифторуксусная кислота

Стабильность и сроки годности лекарственных средств **ОФС.1.1.0009.18**

Взамен ОФС.1.1.0009.15

Настоящая общая фармакопейная статья устанавливает требования к изучению стабильности и установлению сроков годности фармацевтических субстанций химического и минерального происхождения и соответствующих лекарственных препаратов на их основе; фармацевтических субстанций растительного происхождения и лекарственных препаратов, полученных на их основе; гомеопатических лекарственных средств.

Требования к исследованию стабильности и установлению сроков годности биологических лекарственных средств устанавливает ОФС «Стабильность биологических лекарственных средств».

Основные термины и определения

Стабильность — способность лекарственного средства сохранять химические, физические, микробиологические, биофармацевтические и фармакологические свойства в определенных границах в течение установленного срока годности.

Новая фармацевтическая субстанция — фармацевтическая субстанция, содержащая новую молекулу химического вещества, которое ранее не было включено в состав какого-либо зарегистрированного лекарственного препарата. Новая соль, эфир или производное (с ковалентной связью) фармацевтической субстанции, разрешенной для применения, считается новой фармацевтической субстанцией, подлежащей испытаниию

стабильности в соответствии с требования настоящей общей фармакопейной статьи.

Существующая фармацевтическая субстанция — фармацевтическая субстанция, которая была разрешена к применению в составе соответствующего лекарственного препарата, зарегистрированного в установленном порядке.

Стабильная фармацевтическая субстанция — фармацевтическая субстанция считается стабильной, если соответствует требованиям спецификации при хранении при температуре 25 °C и относительной влажности 60% или при температуре 30°C и относительной влажности 60% (65 %) в течение двух лет, а также при температуре 40 °C и относительной влажности 75 % при хранении в течение шести месяцев.

Срок годности — период времени, в течение которого лекарственное средство должно полностью соответствовать спецификации на срок годности при надлежащем хранении в условиях, указанных в фармакопейной статье или нормативной документации и на упаковке.

Период до проведения повторных испытаний стабильных фармацевтических субстанций — период времени до проведения повторных испытаний, в течение которого стабильная фармацевтическая субстанция соответствует спецификации качества и пригодна для производства лекарственного препарата при надлежащих условиях ее хранения. По истечении этого периода серия стабильной фармацевтической субстанции, предназначенная для использования в производстве лекарственного препарата, должна быть повторно испытана на соответствие спецификации и затем незамедлительно использована. Серия стабильной фармацевтической субстанции может быть испытана многократно, и разные части серии могут быть использованы после каждого повторного испытания до тех пор, пока они продолжают соответствовать спецификации.

Дата производства лекарственного препарата — дата выполнения первой производственной операции, связанной со смешиванием

фармацевтической субстанции с другими компонентами лекарственного препарата.

Дата производства фармацевтической субстанции — начальная дата производственной операции по фасовке и упаковке.

Примечание. Для лекарственных препаратов, состоящих из одной фармацевтической субстанции, находящейся в первичной упаковке, датой производства считается начальная дата наполнения первичной упаковки.

Дата выпуска — дата поступления или разрешения поступления лекарственного средства в обращение.

Спецификация на выпуск (спецификация при выпуске) — перечень показателей качества, методов их определения и критериев приемлемости, с помощью которых определяют качество фармацевтической субстанции или лекарственного препарата на момент выпуска.

Спецификация на срок годности — перечень показателей качества, методов их определения и критериев приемлемости, которым должна соответствовать фармацевтическая субстанция или лекарственный препарат в течение срока годности (периода до проведения повторных испытаний для стабильных фармацевтических субстанций).

Промышленная серия — серия фармацевтической субстанции или лекарственного препарата промышленного масштаба, произведенная в производственном помещении с использованием производственного оборудования таким образом, как указано в регистрационном досье.

Опытно-промышленная серия — серия фармацевтической субстанции или лекарственного препарата, произведенная на промышленном оборудовании в соответствии с технологией (или посредством ее моделирования), используемой при полномасштабном серийном производстве. Для твердых лекарственных форм для приема внутрь опытно-промышленная серия, как правило, составляет не менее 1/10 объема промышленной серии или 100000 единиц дозированной лекарственной формы (в зависимости от того, что больше).

Полупроницаемая упаковка — упаковка, которая позволяет проникать через нее растворителю, обычно воде, но препятствует потере растворенного вещества. Механизм проникновения растворителя происходит за счет адсорбции одной поверхностью упаковки, диффузии через материал упаковки и десорбции растворителя с другой поверхности упаковки. Проникновение происходит в соответствии с градиентом парциального давления. К полупроницаемой упаковке относят ампулы, флаконы, пакеты и др. типы упаковки из полимерных материалов (полиэтилена низкой плотности).

***Примечание**:* термины и определения, используемые в настоящей общей фармакопейной статье, указаны также в ОФС «Лекарственные формы», ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

Общие положения

Целью изучения стабильности лекарственного средства является:

- получение данных об изменении качества фармацевтической субстанции или лекарственного препарата с течением времени под влиянием различных факторов окружающей среды, таких как, температура, влажность, свет и др.;

- получение данных о влиянии на качество лекарственного средства системы упаковки и ее элементов, включая укупорочные средства и упаковочные материалы;

- изучение влияния на качество лекарственного препарата результатов взаимодействия фармацевтической субстанции со вспомогательными веществами или результатов взаимодействия двух или более фармацевтических субстанций в лекарственном препарате с фиксированными комбинациями доз и т.д.;

- получение данных о сохранении качества, эффективности и безопасности во время применения лекарственного препарата после вскрытия первичной многодозовой упаковки;

- получение данных о качестве восстановленного/разведенного

лекарственного препарата, в том числе стерильного, после подготовки к применению и в период его применения;

- получение сведений об эффективности антимикробных консервантов, антиоксидантов в лекарственных препаратах и др.

Данные, полученные в ходе изучения стабильности, необходимы:

- для установления срока годности малоустойчивых (нестабильных) фармацевтических субстанций и лекарственных препаратов;

- для установления периода до проведения повторных испытаний стабильных фармацевтических субстанций;

- для установления рекомендуемых требований к надлежащим условиям хранения и транспортирования лекарственного средства и последующего выбора необходимых указаний по его маркировке;

- для выбора надлежащих упаковочных материалов, системы упаковки, включающей укупорочные средства, для конкретного лекарственного средства;

- для установления периода применения и условий хранения восстановленного/разведенного лекарственного препарата;

- для установления, при необходимости, периода применения и условий хранения лекарственного препарата в многодозовой упаковке после первого вскрытия упаковки;

- для обоснования использования необходимой концентрации антимикробных консервантов в лекарственных препаратах и др.

Изучение стабильности должно осуществляться по программе (плану), при разработке которой необходимо учитывать статус исследуемого лекарственного средства:

- новая или существующая фармацевтическая субстанция;

- новый или существующий лекарственный препарат;

- новая лекарственная форма лекарственного препарата.

Программа изучения стабильности лекарственных средств должна включать виды планируемых испытаний (стрессовые, ускоренные,

долгосрочные), выбор серий, описание системы упаковки-укупорки; испытуемые характеристики; методики испытаний; периодичность (частоту) испытаний; требования к условиям хранения лекарственных средств при проведении испытаний.

Особое внимание необходимо обратить на разработку программы изучения стабильности новых лекарственных средств.

Программа изучения стабильности существующих лекарственных средств должна быть основана на уже имеющихся научных сведениях о свойствах исследуемого лекарственного средства в различных практических ситуациях. В зависимости от наличия и характера информации по стабильности существующих лекарственных средств, объем необходимых испытаний при изучении стабильности может быть сокращен.

Общие рекомендации по изучению стабильности лекарственных средств

Требования к выбору методов и методик изучения стабильности.

Изучение стабильности должно включать испытания таких характеристик лекарственного средства, которые подвержены изменениям в процессе хранения и которые, вероятно, могут оказать влияние на качество, безопасность и/или эффективность лекарственного средства. В зависимости от конкретной ситуации объем испытаний по изучению стабильности должен охватить все физические, химические, биологические и микробиологические параметры лекарственного средства. При изучении стабильности лекарственного препарата необходимо также определять содержание антимикробных консервантов, антиоксидантов, проверять функциональные свойства, например, для системы доставки дозы лекарственной формы и т.д.

Должны быть применены валидированные аналитические методики, позволяющие охарактеризовать стабильность. Необходимость проведения повторных испытаний по изучению стабильности и их объем будут зависеть от результатов валидации.

Могут быть применены методы и методики испытаний,

регламентированные фармакопейной статьей или нормативной документацией на конкретное лекарственное средство, если они позволяют выявить различия между показателями качества исследуемого лекарственного средства и продуктами его распада (деградации). При этом все возможные примеси и продукты разложения лекарственного средства, образующиеся в ходе процесса изучения стабильности, должны контролироваться.

В случае необходимости допустимо использование других специальных методов исследований, валидированных по отношению к фармакопейным методам.

Перечень показателей качества, методов их определения и критериев приемлемости, которым должны соответствовать фармацевтическая субстанция или лекарственный препарат, регламентируют *спецификации: на выпуск и на срок годности лекарственного средства.*

Для каждого конкретного испытания лекарственного средства должны быть определены *критерии приемлемости*, представляющие собой числовые пределы, интервалы или другие критерии. В случае испытания фармацевтической субстанции критерии приемлемости должны включать верхние пределы содержания отдельных примесей и продуктов разложения, а также пределы их суммарного содержания, установленные исходя из требований по безопасности и/или эффективности.

Особое внимание необходимо обратить на разработку критериев приемлемости при изучении стабильности нового лекарственного средства, изучение стабильности которого проводится впервые. Критерии приемлемости для существующего лекарственного средства следует устанавливать на основании уже имеющейся информации о его стабильности.

Допускаются приемлемые и обоснованные отклонения одних и тех же показателей качества для одного и того же лекарственного средства в спецификации на выпуск и в спецификации на срок годности, основанные на

оценке стабильности и наблюдаемых изменениях при хранении.

Любые различия между критериями приемлемости в спецификациях на выпуск и на срок годности лекарственного препарата относительно содержания антимикробных консервантов, должны быть подтверждены обоснованной корреляцией химического состава и эффективности этих консервантов, доказанной на этапе фармацевтической разработки для окончательного состава (за исключением концентрации антимикробного консерванта) лекарственного препарата, предназначенного для обращения на фармацевтическом рынке. Необходимо провести испытания стабильности одной исходной серии лекарственного препарата относительно эффективности антимикробных консервантов (в дополнение к их количественному определению) в течение предполагаемого срока годности независимо от того, имеются ли различия между критериями приемлемости относительно содержания антимикробного консерванта в спецификации, применяемой при выпуске и спецификации, применяемой в течение срока годности.

При исследовании стабильности лекарственного препарата одновременно с изучением стабильности действующего и вспомогательного веществ оценивают их совместимость.

При необходимости, как часть официальных исследований стабильности, должны быть проведены испытания стабильности лекарственного препарата после его подготовки к применению или после восстановления/разведения, чтобы получить информацию для маркировки лекарственного препарата относительно подготовки к применению, условиям хранения и периоду использования после подготовки к применению или после восстановления/разведения.

При изучении стабильности возможно получение результатов, выходящих за пределы спецификации, называемых «значительными изменениями».

«Значительное изменение фармацевтической субстанции» означает изменение, после которого фармацевтическая субстанция перестает соответствовать спецификации.

«Значительное изменение лекарственного препарата» означает изменение следующих показателей:

- изменение количественного содержания действующего вещества на 5 % и более по сравнению с содержанием в начале испытания серии;

- превышение содержания любого продукта разложения (деградации) свыше критерия приемлемости;

- несоответствие критериям приемлемости в отношении внешнего вида, физических свойств и функциональных характеристик (например, цвет, разделение фаз, способность к ресуспендированию, спекаемость (комкование), твердость (прочность), доставка одной дозы аэрозоля при однократном нажатии клапана). Вместе с тем, некоторые изменения физических свойств могут быть прогнозируемы в условиях ускоренных испытаний, например, размягчение суппозиториев, расплавление кремов, частичная потеря адгезии для трансдермальных лекарственных препаратов.

Кроме того, в зависимости от лекарственной формы:

- несоответствие критериям приемлемости по значению «pH»;

- несоответствие критериям приемлемости относительно растворения для 12 единиц дозированного лекарственного средства.

Для изучения стабильности лекарственных средств используют долгосрочные, ускоренные, промежуточные испытания стабильности, а также стрессовые испытания, включая испытания на фотостабильность.

Долгосрочные испытания стабильности лекарственных средств представляют собой испытания по изучению стабильности физических, химических, биологических, биофармацевтических и микробиологических характеристик фармацевтической субстанции или лекарственного препарата, проводимые в условиях хранения, заявленных в фармакопейной статье или нормативной документации, в период предполагаемого срока годности

(предполагаемого периода до проведения повторных испытаний).

Полученные данные долгосрочных испытаний стабильности используют для установления срока годности (периода до проведения повторных испытаний), а также для подтверждения предполагаемого срока годности (периода до проведения повторных испытаний) и условий хранения, предлагаемых (или утвержденных) в маркировке лекарственного средства.

Долгосрочные испытания необходимо проводить в рекомендованной для данного лекарственного средства потребительской упаковке при постоянных верхних (наиболее высоких) показателях температуры и относительной влажности установленного режима хранения в течение всего предполагаемого срока годности (периода до проведения повторных испытаний).

В ряде случаев могут требоваться дополнительные испытания при нижней температуре установленного режима хранения (например, для мягких лекарственных форм, для которых возможны изменения их физико-химического состояния при пониженных температурах).

Ускоренные испытания стабильности лекарственных средств представляют собой испытания, спланированные таким образом, чтобы увеличить скорость химического разложения или физического изменения фармацевтической субстанции или лекарственного препарата посредством создания особенно неблагоприятных условий хранения.

Данные, полученные при ускоренных испытаниях стабильности лекарственного средства, являются, как правило, дополнительными к результатам его долгосрочных испытаний, и могут быть использованы для оценки более отдаленных химических эффектов при долгосрочных испытаниях, а также для оценки влияния кратковременных отклонений от условий хранения, регламентируемых фармакопейной статьей или нормативной документацией, которые могут возникнуть, например, при транспортировании. Результаты исследований при ускоренных испытаниях не всегда позволяют прогнозировать физические изменения.

Промежуточные испытания заключаются в изучении стабильности лекарственного средства в условиях, проводимых при температуре 30° С и относительной влажности 65 %, при которых прогнозируется умеренное повышение скорости/степени химического разложения (деградации) или физических изменений фармацевтической субстанции или лекарственного препарата, которые предполагается хранить продолжительное время при температуре 25° С.

Стрессовые испытания представляют собой испытания стабильности лекарственного средства, проводимые в специально созданных стрессовых условиях, как правило, более неблагоприятных, чем условия ускоренных испытаний, с целью исследования вынужденного процесса разложения и установления продуктов и механизмов разложения лекарственного средства.

Стрессовые испытания проводят для оценки наиболее вредного влияния факторов внешней среды (высокие и низкие температуры, влага, кислород и другие компоненты воздуха, свет и т.п.) и зависимости от времени и условий их воздействия.

Стрессовые испытания фармацевтической субстанции – испытания, проводимые с целью оказания помощи в идентификации вероятных продуктов разложения (деградации) фармацевтической субстанции. Изучение продуктов разложения в стрессовых условиях помогает установить пути деградации и стабильность, присущую молекуле, а также подтвердить пригодность аналитических методик, используемых для изучения стабильности, при их разработке и валидации. Характер стрессовых испытаний зависит от конкретной фармацевтической субстанции и вида лекарственной формы лекарственного препарата, для производства которого она предназначена.

Стрессовые испытания фармацевтической субстанции проводят в том случае, если в нормативной документации или научной литературе отсутствуют данные о возможных продуктах ее разложения. Если продукты разложения фармацевтической субстанции известны, например, указаны в

фармакопейной статье, нормативной документации или научной литературе, то можно руководствоваться этими данными и стрессовые испытания не проводить. Отдельное изучение определенных продуктов разложения может не понадобиться, если известно, что эти продукты не образуются в условиях ускоренных или долгосрочных испытаний. Если таких данных нет, то необходимо провести стрессовые испытания.

Стрессовые испытания проводят на одной серии фармацевтической субстанции. Должно быть изучено влияние на фармацевтическую субстанцию:

- температур, превышающих температуры при ускоренных испытаниях с последовательным ее повышением на 10° С (например, 50 °С, 60 °С и т.д.);

- повышенной влажности (например, относительной влажности 75 % и выше);

- окисления, при необходимости;

- фотолиза, при необходимости;

- гидролиза в широком интервале значений pH, если действующее вещество находится в виде раствора или суспензии.

Стрессовые испытания лекарственного препарата включают испытания фотостабильности и параметров, специфических для определения лекарственных форм.

Испытание фотостабильности является неотъемлемой частью стрессовых испытаний новых фармацевтических субстанций и лекарственных препаратов. Объем исследований лекарственного средства определяется наличием или отсутствием изменений, возникающих в результате влияния света.

Для доказательства того, что воздействие света не приводит к недопустимым изменениям, следует оценить характеристики фотостабильности, присущие новым лекарственным средствам. Как правило, испытание фотостабильности проводят на одной серии продукции. Такие испытания следует повторять, если были внесены определенные изменения,

например, в состав, упаковку. Необходимость повторения испытаний зависит от характеристик фотостабильности, определенных первоначально, и от типа внесенных изменений.

Испытание фотостабильности включает, если целесообразно, следующие этапы:

- испытания фармацевтической субстанции;

- испытания лекарственного препарата без первичной упаковки;

- испытания (при необходимости) лекарственного препарата в первичной упаковке;

- испытания (при необходимости) лекарственного препарата во вторичной (потребительской) упаковке.

Объем испытаний фармацевтической субстанции или лекарственного препарата зависит от наличия или отсутствия допустимого изменения по окончании испытания под воздействием света.

План изучения стабильности лекарственного средства может быть полным, предусматривающим испытания образцов по каждому из предусмотренных факторов в каждой точке контроля, и может быть сокращенным. Любой план сокращенных исследований должен позволять адекватно прогнозировать срок годности (период до проведения повторных испытаний) лекарственного средства.

Необходимо учесть потенциальный риск плана сокращенных исследований и установить меньший срок годности (период до проведения повторных испытаний), чем они могли бы быть установлены при проведении полных исследований, вследствие меньшего количества собранных данных.

К планам сокращенных исследований стабильности лекарственных средств относят такие методы, как метод крайних вариантов (брэкетинг) и матричный метод. Планы сокращенных исследований могут быть применены при изучении стабильности большинства типов лекарственных препаратов. При изучении стабильности фармацевтических субстанций матричный метод

имеет ограниченную пользу, а метод крайних вариантов вообще не применим.

Метод крайних вариантов (значений)(брэкетинг) предусматривает построение сокращенного плана исследований стабильности лекарственных препаратов таким образом, что испытывают образцы только с крайними (предельными) значениями в ряду определенного фактора во всех временных точках контроля, что и при проведении исследований по полному плану. План предполагает, что стабильность образцов с любыми промежуточными вариантами в ряду определенного фактора приравнивается к стабильности образцов с крайними значениями.

Факторы метода крайних вариантов — это переменные факторы (например, дозировка, размер упаковки и/или объем наполнения), влияние которых на стабильность лекарственного препарата должно быть оценено согласно плану исследований.

Применение метода крайних вариантов считается нецелесообразным, если нельзя показать, что значения дозировки или размеры системы упаковки и/или объемы наполнения, выбранные для испытаний, являются действительно крайними.

Метод крайних вариантов может быть применим для лекарственных препаратов с разной дозировкой, но имеющих идентичный или очень сходный (близкий) состав, например, для :

- капсул с разной дозировкой, полученных путем заполнения одной и той же смесью порошков, содержимое которых имеет разную массу;

- таблеток с разной дозировкой, полученных путем прессования разных количеств одного и того же исходного гранулята;

- растворов для приема внутрь с разной дозировкой, состав которых незначительно отличается только вспомогательными веществами (например, красителями, корригентами вкуса) и др.

При достаточном обосновании метод крайних вариантов можно применять при изучении стабильности лекарственных препаратов с разной

дозировкой, в составе которых изменяется соотношение количества фармацевтической субстанции и вспомогательных веществ. Если же в лекарственных препаратах с разными дозировками использованы разные вспомогательные вещества, то метод крайних вариантов, как правило, не следует применять.

Выбор метода крайних вариантов может быть применим для лекарственных препаратов, имеющих одинаковую систему упаковки (укупорки), при условии, если один фактор (размер упаковки или объем наполнения) варьирует, а второй остается неизменным.

При наличии обоснования метод крайних вариантов можно применять при изучении лекарственных препаратов с одинаковой упаковкой, но разными укупорочными элементами.

В таблице 1 приведен пример плана, предусматривающего применение метода крайних вариантов для лекарственного препарата, представленного в трех дозировках (50, 75 и 100 мг) и в упаковках трех размеров (15, 100 и 500 мл). В данном примере должно быть показано, что размеры упаковок из полиэтилена высокой плотности вместимостью 15 мл и 500 мл действительно представляют крайние значения фактора. Серии для каждой выбранной комбинации должны пройти испытания в каждой точке контроля, как предусмотрено в плане полных исследований.

Таблица 1 – Пример плана, предусматривающего выбор метода крайних вариантов

Дозировка, мг		**50**			**75**			**100**		
Серия		1	2	3	1	2	3	1	2	3
Размер упаковки, мл	**15**	Т	Т	Т				Т	Т	Т
	100									
	500	Т	Т	Т				Т	Т	Т
***Примечание**:* «Т» означает образец, подлежащий испытаниям										

Матричный метод предусматривает построение плана исследований стабильности таким образом, что в определенной момент времени отбирают и исследуют только часть от общего количества возможных образцов для

всех комбинаций факторов. При последующем контроле (в последующий момент времени) исследуют другой комплект образцов из общего количества для всех комбинаций факторов. Метод предполагает, что стабильность испытанных образцов отождествляется со стабильностью всех образцов в данный момент времени. Должны быть выявлены отличия в образцах для одного и того же лекарственного препарата, например, отличия, связанные с разными сериями, разной дозировкой, разным размером системы упаковки и укупорочных элементов одинакового типа и, возможно, в некоторых случаях с разными системами упаковки и укупорочных элементов.

Если стабильность лекарственного препарата зависит от вторичной упаковки, то матричный метод можно применять параллельно для всех систем упаковки (укупорки).

Каждое условие хранения должно подвергаться обработке отдельно по своему собственному плану, предусматривающему использование матриц. Матричный метод не следует применять для всех испытуемых факторов, но при наличии обоснования для различных испытуемых факторов могут быть применены альтернативные планы, предусматривающие использование матриц.

Матричный метод может быть применим для лекарственных препаратов с разной дозировкой, но имеющих идентичный или очень сходный состав, например, для :

- капсул с разной дозировкой, полученных путем заполнения одной и той же смесью порошков, содержимое которых имеет разную массу;

- таблеток с разной дозировкой, полученных путем прессования разных количеств одного и того же исходного гранулята;

- растворов для приема внутрь с разной дозировкой, состав которых незначительно отличается только вспомогательными веществами (например, красителями, ароматизаторами) и др.

Другими примерами факторов матричного метода являются серии лекарственного препарата, полученные с использованием одного и того же

процесса и оборудования, а также размеры упаковки и (или) объем наполнения для одной и той же системы упаковки (укупорки).

При наличии обоснования матричный метод можно применять при изучении стабильности лекарственных препаратов с разной дозировкой, в составе которых изменяется соотношение количества фармацевтической субстанции и вспомогательных веществ, либо используются разные вспомогательные вещества, а также лекарственных препаратов с различной дозировкой, которые имеют разные системы упаковки (укупорки).

При построении плана исследований стабильности лекарственных препаратов матричным методом следует предусмотреть, чтобы в начальной и конечной точках контроля были испытаны образцы, соответствующие всем комбинациям выбранных факторов, а в промежуточных точках контроля – образцы с определенными наборами выбранных комбинаций факторов.

Примеры матричного планирования точек контроля для лекарственного препарата с двумя значениями дозировки (S1 и S2) приведены в таблицах 2 и 3. Выражения *«сокращение наполовину»* и *«сокращение на треть»* означают степень сокращения испытаний относительно первоначального плана полного исследования. Например, *«сокращение наполовину»* — это исключение одной из каждых двух точек контроля, предусмотренных планом полного исследования, а *«сокращение на треть»* — исключение одной из каждых трех точек контроля. В примерах, приведенных в таблицах 2 и 3, сокращение составляет менее половины и менее одной трети, поскольку включены полные исследования всех комбинаций факторов в некоторых точках контроля. Эти примеры включают полный комплекс испытаний в начальной и конечной точках контроля и на момент истечения срока 12 месяцев от начала исследований. Следовательно, максимальное сокращение составляет менее половины (24/48) или одной трети (16/48), то есть реально составляет 15/48 или 10/48 соответственно.

Таблица 2 — Пример плана матричного метода точек контроля для лекарственного препарата с двумя значениями дозировки *«сокращение наполовину»*

Точки контроля (месяцы)			**0**	**3**	**6**	**9**	**12**	**18**	**24**	**36**
Дозировка	**S1**	**Серия 1**	T	T		T	T		T	T
		Серия 2	T	T		T	T	T		T
		Серия 3	T		T		T	T		T
	S2	**Серия 1**	T		T		T		T	T
		Серия 2	T	T		T	T	T		T
		Серия 3	T		T		T		T	T
***Примечание**:* «T» означает образец, подлежащий испытаниям										

Таблица 3 — Пример плана матричного метода точек контроля для лекарственного препарата с двумя значениями дозировки *«сокращение на треть»*

Точки контроля (месяцы)			**0**	**3**	**6**	**9**	**12**	**18**	**24**	**36**
Дозировка	**S1**	**Серия 1**	T	T		T	T		T	T
		Серия 2	T	T	T		T	T		T
		Серия 3	T		T	T	T	T		T
	S2	**Серия 1**	T		T	T	T	T	T	T
		Серия 2	T	T		T	T		T	T
		Серия 3	T	T	T		T	T	T	T
***Примечание**:* «T» означает образец, подлежащий испытаниям										

В таблицах 4 и 5 приведены дополнительные примеры плана матричного метода для лекарственного препарата, представленного в трех значениях дозировок и в упаковках трех размеров. В таблице 4 приведено матричное планирование только точек контроля, а в таблице 5 — матричное планирование точек контроля и факторов. Согласно таблице 4 испытаниям подвергаются образцы, соответствующие всем комбинациям факторов, включая серии, значения дозировки и размеры упаковки, в то время как согласно таблице 5 образцы с определенными комбинациями значений этих факторов испытанию не подлежат.

Таблица 4 — Пример плана матричного метода точек контроля для лекарственного препарата с тремя значениями дозировки

Дозировка	**S1**			**S2**			**S3**		
Размер упаковки	A	B	C	A	B	C	A	B	C
Серия 1	T1	T2	T3	T2	T3	T1	T3	T1	T2

Серия 2	Т2	Т3	Т1	Т3	Т1	Т2	Т1	Т2	Т3
Серия 3	Т3	Т1	Т2	Т1	Т2	Т3	Т2	Т3	Т1

Примечание: обозначения:
S1, S2, S3 — различные значения дозировки;
A, B, C — различные размеры упаковки;
Т — образец, подлежащий испытанию;
Т1, Т2, Т3 — точки контроля, где:

Точка контроля (месяцы)	**0**	**3**	**6**	**9**	**12**	**18**	**24**	**36**
Т1	Т		Т	Т	Т	Т	Т	Т
Т2	Т	Т		Т	Т		Т	Т
Т3	Т	Т	Т		Т	Т		Т

Таблица 5 — Пример плана матричного метода точек контроля для лекарственного препарата с тремя значениями дозировки

Дозировка	**S1**			**S2**			**S3**		
Размер упаковки	A	B	C	A	B	C	A	B	C
Серия 1	Т1	Т2		Т2		Т1		Т1	Т2
Серия 2		Т3	Т1	Т3	Т1		Т1		Т3
Серия 3	Т3		Т2		Т2	Т3	Т2	Т3	

Примечание: обозначения:
S1, S2, S3 — различные дозировки;
A, B, C— различные размеры упаковки;
Т — образец, подлежащий испытанию;
Т1, Т2, Т3 — точки контроля, где:

Точка контроля (месяцы)	**0**	**3**	**6**	**9**	**12**	**18**	**24**	**36**
Т1	Т		Т	Т	Т	Т	Т	Т
Т2	Т	Т		Т	Т		Т	Т
Т3	Т	Т	Т		Т	Т		Т

При применении плана матричного метода, необходимо учитывать следующие данные (перечень вопросов не является исчерпывающим):

- осведомленность о вариабельности данных;

- ожидаемая стабильность лекарственного препарата;

- наличие данных, дополнительно подтверждающих стабильность;

- различия стабильности лекарственного средства в рамках одного фактора и между разными факторами;

- число комбинаций факторов при исследовании.

Как правило, использование матричного метода применимо, если дополнительные данные свидетельствуют о прогнозируемой стабильности лекарственного препарата. Использование матричного метода возможно, если дополнительные данные, подтверждающие стабильность, свидетельствуют о незначительной вариабельности. Вместе с тем, если дополнительные данные подтверждают среднюю вариабельность, то использование матричного метода должно быть обосновано статистически. Если дополнительные данные свидетельствуют о значительной вариабельности, то использование матричного метода неприменимо.

Статистическое обоснование должно основываться на оценке способности плана матричного метода обнаруживать различия между факторами, определяющими скорость деградации, или давать точные результаты при установлении срока годности.

Если принято решение об использовании плана матричного исследования, то необходимо определить возможную степень сокращения плана полных исследований в зависимости от количества комбинаций факторов, подлежащих оценке. Чем больше факторов, касающихся лекарственного препарата и чем больше уровней в каждом факторе, тем большая степень сокращения может быть обоснована. Однако любой сокращенный план исследований должен позволять адекватно прогнозировать срок годности лекарственного препарата.

Оборудование. При изучении стабильности должно быть использовано оборудование, обеспечивающее необходимые условия испытаний. Для обеспечения надлежащей температуры и, при необходимости, относительной влажности, используют термостаты, термошкафы, климатические камеры или другие устройства, позволяющие автоматически поддерживать заданные температуру с точностью ±2°С и относительную влажность с точностью ±5%. Приемлемые колебания температуры и относительной влажности оборудования для хранения при проведении испытаний стабильности считают допустимыми.

Для обеспечения надлежащих условий при изучении фотостабильности используют соответствующие источники света.

Используемое оборудование должно быть аттестовано, поверено и должно обслуживаться в соответствии с установленными требованиями.

Оборудование, используемое при изучении стабильности лекарственных средств, должно давать возможность контролировать и, по возможности, регистрировать необходимые параметры в рамках диапазонов, указанных в настоящей общей фармакопейной статье, в течение установленного периода испытаний.

Климатические зоны. При выборе условий проведения испытаний стабильности лекарственного средства, необходимо учитывать влияние климатических условий в том регионе мира, где предполагается применение лекарственного средства.

На основании преобладающих ежегодных климатических условий в регионе мир разделен на четыре климатические зоны.

Информация о средней годовой кинетической температуре и средней годовой относительной влажности в различных климатических зонах, определяет выбор условий проведения долгосрочных испытаний при изучении стабильности лекарственных средств. Средняя кинетическая температура включает ежегодные изменения, то есть, самые низкие и самые высокие температуры в регионе в течение зимы и лета, она может быть рассчитана на основании климатических данных.

В таблице 6 приведены рекомендуемые условия проведения долгосрочных испытаний при изучении стабильности лекарственных средств в климатических зонах мира, разработанные на основании представленных в таблице критериев (данных).

Таблица 6 — Рекомендуемые условия проведения долгосрочных испытаний стабильности в зависимости от климатических зон

Климатиче	**Описание**	**Критерии (средняя годовая температура, измеренная на**	**Условия проведения**

ская зона		**открытом воздухе/ среднее парциальное давление водяного пара)**	**долгосрочных испытаний**
1	Умеренный климат	Менее или равно15°С/ менее или равно 11гПа	21°С/45%
II	Субтропический или средиземноморский климат	От более 15°С до 22 °С / от более 11гПа до 18гПа	25°С/60%
III	Жаркий и сухой климат	Более 22°С/ менее или равно15гПа	30°С/35%
IV А	Жаркий и влажный климат	Более 22°С/ более 15гПа до 27гПа	30°С/65%
IVB	Жаркий и очень влажный климат	Более 22°С/ более 27гПа	30°С/75%

Для Российской Федерации применимы условия, указанные для климатических зон I и II.

Требования к выбору серий при изучении стабильности.

В зависимости от масштаба производства для изучения стабильности рекомендуется использовать промышленные серии лекарственных средств, в установленных случаях допускается использовать опытно-промышленные серии. Информацию о стабильности лабораторных серий лекарственных средств можно использовать только как вспомогательную.

Отбираемые опытно-промышленные серии фармацевтической субстанции должны быть получены с использованием того же пути синтеза, как и промышленные серии, с использованием способа производства, моделирующего окончательный процесс, который будет использоваться на промышленном производстве. Качество фармацевтической субстанции, в целом для серий, отбираемых для изучения стабильности, должно быть репрезентативным в отношении качества продукта, который будет производиться в промышленном масштабе.

Производство отбираемых опытно-промышленных серий лекарственного препарата должно моделировать производство промышленных серий и обеспечивать получение продукции такого же

качества и соответствовать той же спецификации, что и серии, поступающие в обращение. Если возможно, серии лекарственного препарата должны быть получены с использованием разных серий фармацевтической субстанции.

Для лекарственных препаратов, имеющих различную дозировку и разную упаковку, исследования стабильности должны быть проведены отдельно для каждой индивидуальной дозировки лекарственной формы и каждого размера и типа упаковки лекарственного препарата, за исключением тех случаев, когда применяют методы сокращенных исследований в соответствии с планом исследования.

При изучении стабильности нового лекарственного средства данные по стабильности должны быть получены, как минимум, для трех первичных серий. Серии новой фармацевтической субстанции должны быть, по крайней мере, опытно-промышленными. Две из трех серий нового лекарственного препарата должны быть, как минимум, опытно-промышленные, третья серия может быть меньшей.

При изучении стабильности существующей фармацевтической субстанции должны быть использованы результаты долгосрочных и ускоренных исследований стабильности, по крайней мере, двух промышленных или трех опытно-промышленных серий.

При выборе серий существующего лекарственного препарата необходимо учитывать свойства лекарственной формы и стабильность используемой фармацевтической субстанции. В случае обычных лекарственных форм (например, твердая лекарственная форма с обычным высвобождением, растворы) и фармацевтических субстанций, о которых известно, что они стабильны, допускается использовать данные при исследовании стабильности, по меньшей мере, двух первичных опытно-промышленных серий.

Относительно лекарственных форм с высвобождением, отличным от стандартного (например, лекарственная форма с модифицированным высвобождением, таблетки, диспергируемые в полости рта, и др.) или

фармацевтических субстанций, о которых известно, что они нестабильны, необходимо использовать данные исследования стабильности трех первичных серий, две из которых должны быть, по крайней мере, опытно-промышленными, третья серия может быть меньшей.

Требования к упаковке лекарственных средств при изучении стабильности

Упаковка, укупорочные средства и другие элементы упаковки лекарственного средства при изучении стабильности должны быть идентичны системе упаковки, регламентированной фармакопейной статьей или нормативной документацией и рекомендованной для обращения на фармацевтическом рынке, в том числе для хранения и транспортирования.

При изучении стабильности фармацевтических субстанций, упаковка которых является крупногабаритной (фляги, бутыли, железные бочки, жестяные барабаны, пакеты полимерные, мешки бумажные трех- и четырехслойные и т.д.), допускается использование аналогичной упаковки меньшей емкости, достаточной для моделирования условий оригинальной упаковки. Например, если в соответствии с фармакопейной статьей или нормативной документацией упаковка фармацевтической субстанции представляет собой пакеты, упакованные в фибровые барабаны, то образцы для исследования стабильности могут быть упакованы в пакеты из того же упаковочного материала, помещенные в барабаны меньшего размера, изготовленные из материала, аналогичного или идентичного материалу фибровых барабанов, в которых фармацевтическая субстанция поступает в обращение.

Испытания лекарственных препаратов при изучении стабильности необходимо проводить в потребительской упаковке. Любые испытания лекарственного препарата без первичной упаковки или в упаковке из иных упаковочных материалов, могут составлять полезную часть стрессовых испытаний лекарственной формы или, соответственно, рассматриваться как дополнительная подтверждающая информация.

Если есть вероятность, что на стабильность лекарственного препарата может оказать влияние система упаковки, включающая укупорочные средства, при взаимодействии с содержимым лекарственного препарата (например, при контакте укупорочного средства (пробки), с жидкой лекарственной формой при транспортировке), то при изучении стабильности необходимо наряду с исследованием образцов в прямом (вертикальном) положении, исследовать образцы лекарственного средства в перевернутом или горизонтальном положениях, то есть такие образцы, которые контактируют с укупорочным средством (например, пробкой) для определения влияния материала укупорочного средства (пробки) на качество лекарственного препарата. Должны быть зафиксированы все сочетания различных систем упаковки (укупорки) исследуемого лекарственного средства при изучении стабильности.

Кроме того, в случае изучения стабильности лекарственных препаратов после вскрытия первичной многодозовой упаковки, необходимо провести исследования, подтверждающие, что пробка, используемая в многодозовой упаковке, способна выдержать условия повторяемого открывания и закрывания и при этом полностью обеспечить сохраняемость эффективности, чистоты и качества лекарственного препарата на протяжении периода, указанного в инструкции по медицинскому применению.

Периодичность испытаний стабильности

Периодичность проводимых испытаний стабильности новых и существующих лекарственных средств должна быть достаточной для определения характеристик стабильности фармацевтической субстанции или лекарственного препарата. Количество точек контроля результатов испытаний зависит от запланированного метода изучения стабильности и предполагаемого срока годности лекарственного средства (периода до проведения повторных испытаний стабильной фармацевтической субстанции).

Если предполагаемый срок годности лекарственного средства (период

до проведения повторных испытаний стабильной фармацевтической субстанции) составляет 12 месяцев и более, то исследования стабильности в условиях долгосрочных испытаний, как правило, следует проводить:

- каждые 3 месяца в течение первого года;

- каждые 6 месяцев в течение второго года;

- в дальнейшем ежегодно на протяжении всего предлагаемого срока годности (периода до проведения повторных испытаний).

При изучении стабильности в условиях ускоренных испытаний продолжительностью 6 месяцев рекомендуется применять не менее трех точек контроля, включая контроль в начале и при завершении исследований (например, 0, 3 и 6 месяцев). Если предполагают, на основании имеющегося опыта, что результаты ускоренных испытаний могут вплотную приблизиться к критериям «значительного изменения», то необходимо расширить исследования, увеличив количество образцов в конечной точке контроля, либо включив четвертую точку контроля в план исследования стабильности.

Если из-за «значительного изменения» при изучении стабильности в условиях ускоренных испытаний необходимо проведение промежуточных испытаний, то рекомендуется применять, как минимум, четыре точки контроля, включая контроль в начале и при завершении испытаний (например, 0, 3, 6 и 12 месяцев), если продолжительность изучения составляет 12 месяцев.

Для лекарственных препаратов, при соответствующем обосновании, могут быть применены сокращенные планы исследования стабильности (метод крайних вариантов, матричный метод), в которых частота проведения испытаний может быть уменьшена или когда испытания комбинаций определенных факторов допускается проводить не в полном объеме.

Требования к условиям хранения лекарственных средств при изучении стабильности

Лекарственное средство следует изучать в условиях (с соответствующими допустимыми отклонениями), позволяющими

исследовать его термическую стабильность и, при необходимости, его чувствительность к воздействию влаги, а для лекарственных препаратов проверить возможность потери растворителя. Выбранные условия исследований должны соответствовать условиям и продолжительности хранения, транспортирования и последующего применения лекарственного средства, с учетом климатических условий местности, для реализации в которой предназначен лекарственный препарат.

Условия хранения лекарственных средств при изучении стабильности, необходимо отслеживать и регистрировать.

Для изучения стабильности желательно использовать данные долгосрочных испытаний, охватывающие весь период предполагаемого срока годности (периода до проведения повторных испытаний) лекарственного средства.

Если таких данных нет, то для изучения стабильности допускается применять результаты долгосрочных испытаний, проведенных в течение:

- не менее 12 месяцев – для новой фармацевтической субстанции, для нового лекарственного препарата и для существующего лекарственного препарата, представляющего собой лекарственную форму с высвобождением, отличным от стандартного (например, лекарственная форма с модифицированным высвобождением; таблетки, диспергируемые в полости рта, и др.) или содержащего фармацевтическую субстанцию, о которой известно, что она нестабильна;

- не менее 6 месяцев – для существующей фармацевтической субстанции и для существующего лекарственного препарата, представляющего собой обычную лекарственную форму (например, твердая дозированная лекарственная форма с обычным высвобождением; растворы и др.) или содержащего фармацевтическую субстанцию, о которой известно, что она стабильна.

Во всех случаях изучения имеющихся данных по стабильности долгосрочные испытания необходимо продолжать в течение времени,

достаточного для того, чтобы охватить предполагаемый срок годности (период до проведения повторных испытаний) лекарственного средства и дополнительно полученные результаты этих исследований также использовать при изучении стабильности. В установленных случаях могут быть использованы данные, полученные при ускоренных и, если необходимо, промежуточных испытаниях.

В зависимости от климатической зоны, в которой предполагается применение лекарственного средства, выбирают условия хранения при долгосрочных испытаниях в соответствии с данными, приведенными в таблице 6.

Условия хранения и минимальная продолжительность изучения стабильности лекарственных средств при долгосрочных, ускоренных и, если необходимо, промежуточных испытаниях приведены в таблицах 7-10.

Могут быть применены и другие условия хранения, если это обосновано.

Общий случай. Если для лекарственного средства не требуются условия хранения, приведенные в таблицах 8-10, то при исследовании стабильности должны быть обеспечены условия, указанные в таблице 7.

Таблица 7 – Условия испытаний лекарственных средств «Общий случай».

Наименование испытаний	**Условия хранения (температура и относительная влажность)**	**Минимальная продолжительность изучения стабильности на момент применения (месяцы)**
Долгосрочные[1]	(25±2)°С и (60±5)% или (30±2)°С и (65±5)% или (30±2)°С и (75±5)%	6[3] или 12[4,5]
Промежуточные[2]	(30±2)°С и (65±5)%	6
Ускоренные	(40±2) °С и (75±5) %	6
Примечание. 1.Решение по выбору условий долгосрочных испытаний принимает заявитель. Испытания в неблагоприятных условиях могут быть альтернативными условиям испытаний при температуре (25±2) °С и относительной влажности (60±5) % или температуре (30±2) °С и относительной влажности (65±5) %.		

2.Если долгосрочные испытания проводят при температуре (30±2) °С и относительной влажности (65±5) % или при температуре (30±2) °С и относительной влажности (75±5) %, то промежуточные испытания не проводят.
3.Для существующей фармацевтической субстанции и для существующего лекарственного препарата, представляющего собой обычную лекарственную форму или содержащего фармацевтическую субстанцию, о которой известно, что она стабильна.
4.Для новой фармацевтической субстанции, для нового лекарственного препарата и для существующего лекарственного препарата, представляющего собой лекарственную форму с высвобождением, отличным от обычного, или содержащим фармацевтическую субстанцию, о которой известно, что она нестабильна.
5.Предварительный срок годности нового лекарственного препарата не должен превышать более чем в 2 раза период проведения долгосрочных испытаний лекарственного препарата.

Если в течение 6 месяцев ускоренных испытаний наблюдается «значительное изменение» в любой момент времени, то необходимо выполнить дополнительно промежуточные испытания в рекомендованных условиях хранения. Результаты должны оцениваться по отношению к критерию «значительное изменение» (это применимо в том случае, если долгосрочные испытания проводят при температуре (25±2) °С и относительной влажности (60±5) %), и включать все исследования долгосрочных испытаний. Промежуточные испытания должны включать исследования всех критериев, если не обосновано иное, и должны быть выполнены, как минимум, в течение 6 месяцев (при общей продолжительности исследований 12 месяцев).

Хранение в холодильнике. При исследовании стабильности лекарственных средств, предназначенных для хранения в холодильнике, применяют условия, указанные в таблице 8.

Таблица 8 – Условия испытаний лекарственных средств, предназначенных для хранения в холодильнике

Наименование испытаний	**Условия хранения (температура и относительная**	**Минимальная продолжительность изучения стабильности на момент**

	влажность)	**применения (месяцы)**
Долгосрочные	(5±3)°C	6[2] или 12[3]
Ускоренные[1]	(25±2) °C и (60+5) % или (30±2) °C и (65±5) % или (30±2) °C и (75±5) %	6

Примечание.

1.Выбор условий для ускоренных испытаний основан на оценке рисков. Испытания при неблагоприятных условиях могут быть альтернативой испытанию при температуре (25±2) °C и относительной влажности (60±5) % или температуре (30±2) °C и относительной влажности (65±5) %.

2.Для существующей фармацевтической субстанции и для существующего лекарственного препарата, представляющего собой обычную лекарственную форму или содержащего фармацевтическую субстанцию, о которой известно, что она стабильна.

3.Для новой фармацевтической субстанции, для нового лекарственного препарата и для существующего лекарственного препарата, представляющего собой лекарственную форму с высвобождением, отличным от обычного, или содержащего фармацевтическую субстанцию, о которой известно, что она нестабильна.

Если в условиях ускоренных испытаний лекарственных средств, предназначенных для хранения в холодильнике, в промежуток времени между третьим и шестым месяцами испытаний наблюдается «значительное изменение», предполагаемый срок годности (период до проведения повторных испытаний) должен быть установлен на основании данных, полученных в реальном времени в условиях долгосрочных испытаний.

Если «значительное изменение» наблюдается в течение первых трех месяцев в условиях ускоренных испытаний, то следует получить информацию о воздействии кратковременных отклонений от условий хранения, указанных в маркировке, которое может иметь место, например, при транспортировании. Если целесообразно, рассмотрение данного вопроса должно быть подтверждено дальнейшими исследованиями одной серии лекарственного средства в течение периода менее 3 месяцев, но при большей, чем обычно, периодичности проведения испытаний. Считается, что нет необходимости продолжать ускоренные испытания лекарственного средства

в течение шести месяцев, если в течение первых трех месяцев произошло «значительное изменение».

Если лекарственный препарат, предназначенный для хранения в холодильнике, упакован в полупроницаемую упаковку, то дополнительно должны быть получены данные по оценке потери воды.

Хранение в морозильной камере. При исследовании стабильности лекарственных средств, предназначенных для хранения в морозильной камере, применяют условия, указанные в таблице 9.

Таблица 9 – Условия испытаний лекарственных средств, предназначенных для хранения в морозильной камере

Наименование испытания	**Условия хранения (температура)**	**Минимальная продолжительность изучения стабильности на момент применения (месяцы)**
Долгосрочные	-(20±5)°C	6[1] или 12[2]
Примечание. 1.Для существующей фармацевтической субстанции и для существующего лекарственного препарата, представляющего собой обычную лекарственную форму или содержащего фармацевтическую субстанцию, о которой известно, что она стабильна. 2. Для новой фармацевтической субстанции, для нового лекарственного препарата и для существующего лекарственного препарата, представляющего собой лекарственную форму с высвобождением, отличным от обычного, или содержащего фармацевтическую субстанцию, о которой известно, что она нестабильна.		

Для лекарственных средств, предназначенных для хранения в морозильной камере, срок годности лекарственного средства (период до проведения повторных испытаний) должен основываться на данных, полученных в реальном времени при хранении в условиях долгосрочных испытаний.

Поскольку условия хранения для ускоренных испытаний новых или существующих лекарственных средств, предназначенных для хранения в морозильной камере, отсутствуют, следует провести испытание на единичной серии лекарственного средства при повышенной температуре (например, (5±3) °C или (25±2) °C или (30±2) °C) в течение подходящего

отрезка времени, чтобы изучить воздействие кратковременных отклонений от условий хранения, указанных в маркировке, например, при транспортировании.

Хранение ниже -20 °С. Испытания новых и существующих лекарственных средств, подлежащих хранению при температуре ниже -20 °С, следует проводить в условиях, обоснованных в каждом отдельном случае.

При установлении условий изучения стабильности лекарственных препаратов необходимо учитывать проницаемость рекомендуемой упаковки.

Проницаемость упаковки определяется толщиной и коэффициентом проницаемости. Для лекарственных препаратов, упакованных *в герметичную упаковку,* чувствительность к действию влаги или возможность потери растворителя не является критичным, так как упаковка обеспечивает постоянный барьер, препятствующий проникновению влаги или потере растворителя, например, алюминиевые тубы, запаянные стеклянные ампулы и др. Поэтому исследования стабильности лекарственных препаратов, которые хранят в герметичной упаковке, могут быть проведены при любых контролируемых условиях или в условиях влажности окружающей среды.

Для лекарственных препаратов на водной основе, упакованных *в полупроницаемую упаковку*, в дополнение к изучению физической, химической, биологической и/или микробиологической стабильности, необходимо оценить возможную степень потери воды.

Испытание лекарственных препаратов, упакованных в полупроницаемую упаковку, следует проводить в условиях хранения при сниженной относительной влажности (таблица 10). Необходимо доказать, что лекарственные препараты, хранящиеся в полупроницаемой упаковке, могут выдерживать условия хранения при низкой относительной влажности.

Для лекарственных препаратов, содержащих другие (неводные) растворители рекомендуется разрабатывать и применять сопоставимые подходы к изучению стабильности.

Таблица 10 – Условия испытаний лекарственных препаратов, упакованных в полупроницаемую упаковку

Наименование испытаний	**Условия хранения (температура и относительная влажность)**	**Минимальная продолжительность изучения стабильности на момент применения (месяцы)**
Долгосрочные[1]	(25±2) °С и (40±5) % или (30±2) °С и (35±5) %	6[3] или 12[4]
Промежуточные[2]	(30±2) °С и (35±5) %	6
Ускоренные	(40±2) °С и не более 25 %	6
Примечание. 1.Решение по выбору условий долгосрочных испытаний принимает заявитель. Испытания при температуре (30±2) °С и относительной влажности (35±5) % могут быть альтернативными испытаниям при температуре (25±2) °С и относительной влажности (40±5) %. 2.Если долгосрочные испытания проводят при температуре (30±2) °С и относительной влажности (35±5) %, то промежуточные испытания в этом случае не проводят. 3.Для существующего лекарственного препарата, представляющего собой обычную лекарственную форму или содержащего фармацевтическую субстанцию, о которой известно, что она стабильна. 4.Для нового лекарственного препарата и для существующего лекарственного препарата, представляющего собой лекарственную форму с высвобождением, отличным от обычного, или содержащего фармацевтическую субстанцию, о которой известно, что она нестабильна.		

Если в условиях ускоренных испытаний новых и существующих лекарственных препаратов, упакованных в полупроницаемую упаковку, в течение шести месяцев хранения наблюдается «значительное изменение», не связанное с потерей воды, следует провести дополнительные промежуточные испытания в условиях, указанных в таблице 7 «Общий случай» с целью оценки влияния температуры (30±2) °С.

Если при ускоренных испытаниях в течение шести месяцев хранения наблюдается «значительное изменение» только по показателю «Потеря воды», то нет необходимости проводить промежуточные испытания. Вместе с тем, необходимо установить данные, доказывающие, что в данном

лекарственном препарате нет «значительного изменения» по показателю «Потеря воды» в течение предлагаемого срока хранения при температуре (25±2) °С и относительной влажности (40±5) %) или при температуре (30±2) °С и относительной влажности (35±5) %).

Если при ускоренных испытаниях наблюдается «значительное изменение» по показателю «Потеря воды» и другого показателя, а долгосрочные испытания проводятся при температуре (25±2) °С и относительной влажности (40±5) %), то необходимо провести дополнительно промежуточные испытания для оценки температурного эффекта при температуре (30±2) °С и относительной влажности (65±5) %).

Для нового или существующего лекарственного препарата, упакованного в полупроницаемую упаковку, после хранения в течение трех месяцев при температуре 40 °С и относительной влажности не более 25 % «значительным изменением» считается потеря воды, составляющая 5 % от изначального ее содержания. Тем не менее, для упаковок вместимостью 1 мл или менее 1 мл, или для лекарственных препаратов в однодозовой упаковке, могут быть допустимы потери воды на 5 % или более при хранения в течение трех месяцев при температуре 40 °С и относительной влажности не более 25 %.

Альтернативным подходом изучения стабильности при низкой относительной влажности в условиях, рекомендованных в таблице 5, является изучение стабильности при более высокой относительной влажности, например, 60-75%, и определение путем расчетов потери воды при низкой влажности. С этой целью экспериментальным путем определяют коэффициент проницаемости для системы упаковка/укупорочное средство или используют расчетный коэффициент потери воды во время испытания при двух различных значениях относительной влажности, но при одной и той же температуре. Коэффициент проницаемости для системы упаковка/укупорочное средство может быть определен экспериментально с использованием условий «наихудшего случая» для исследуемого

лекарственного препарата, например, в ряду лекарственных препаратов с разной концентрацией одного и того же действующего вещества для изучений выбирают лекарственный препарат с наименьшей концентрацией.

Обязательство продолжения программы изучения стабильности

Для изучения стабильности и установления срока годности (периода до проведения повторных испытаний) новых и существующих лекарственных средств могут быть использованы данные, охватывающие или не охватывающие период, равный предполагаемому сроку годности (периоду до проведения повторных испытаний) лекарственного средства.

Если имеются данные долгосрочных испытаний стабильности для трех промышленных серий, охватывающие период, равный предлагаемому сроку годности (периоду до проведения повторных испытаний) лекарственного средства, то нет необходимости принимать обязательство проводить дальнейшее изучение стабильности.

Если имеющиеся данные долгосрочных испытаний стабильности не охватывают весь предлагаемый срок годности (предполагаемый период до проведения повторных испытаний) лекарственного средства, то следует принять обязательство продолжить изучение стабильности, чтобы точно и окончательно установить срок годности (период до проведения повторных испытаний) лекарственного средства.

Должно быть принято одно из следующих обязательств:

1) если имеются данные долгосрочных испытаний стабильности, как минимум, для трех промышленных серий, необходимо принять обязательство продолжать эти испытания в течение всего предлагаемого срока годности (периода до проведения повторных испытаний);

2) если имеются данные долгосрочных испытаний стабильности менее чем для трех промышленных серий лекарственного средства, то принимают обязательство продолжить испытания стабильности для этих серий в течение всего предполагаемого срока годности (периода до проведения повторных испытаний), кроме того, провести аналогичные долгосрочные испытания

дополнительных промышленных серий на протяжении всего предполагаемого срока годности (периода до проведения повторных испытаний), а также дополнительно для лекарственных препаратов - провести ускоренные испытания в течение шести месяцев. Таким образом, суммарное количество серий должно составить, по крайней мере, три, и они должны быть исследованы на протяжении всего предполагаемого срока годности (периода до проведения повторных испытаний);

3) если данных по стабильности промышленных серий лекарственного средства не имеется, то следует принять обязательство провести долгосрочные испытания стабильности исходных трех промышленных серий в течение предполагаемого срока годности (предполагаемого периода до проведения повторных испытаний) и дополнительно для лекарственных препаратов провести ускоренные испытания в течение 6 месяцев.

Последующее изучение стабильности лекарственных средств

После регистрации лекарственного средства и выпуска его в обращение производитель (разработчик) обязан продолжить работу по изучению стабильности лекарственного средства с целью подтверждения, что все дальнейшие серии лекарственного средства будут соответствовать спецификации (требованиям фармакопейной статьи или нормативной документации) при соблюдении условий хранения, указанных в маркировке, в течение установленного срока годности (периода до проведения повторных испытаний).

Количество серий лекарственного средства и периодичность испытаний должны обеспечивать достаточный объем данных для проведения анализа тенденций изменения. Для последующего изучения стабильности необходимо не менее одного раза в год использовать, как минимум, одну произведенную серию фармацевтической субстанции или одну серию произведенного лекарственного препарата в каждой дозировке и в каждом виде первичной упаковки, за исключением тех случаев, когда производственные серии лекарственных средств в данном году не

выпускались. В некоторых случаях в последующее изучение стабильности могут быть включены дополнительные серии лекарственного средства.

Последующее изучение стабильности должно обеспечивать выявление любых изменений стабильности (например, изменения количества продуктов деградации, изменение скорости растворения и др.). Любое подтвержденное «значительное изменение», результаты испытаний, не соответствующие спецификации или нетипичные тенденции должны быть проанализированы.

Особенности изучения стабильности отдельных лекарственных средств

Особенности изучения стабильности лекарственных препаратов

Изучение стабильности новых лекарственных форм. Новая лекарственная форма определяется как лекарственный препарат, который является другим видом фармацевтической продукции, но содержит то же действующее вещество (вещества), что и зарегистрированный в установленном порядке лекарственный препарат, находящийся в обращении на фармацевтическом рынке.

К таким видам фармацевтической продукции относят:

- лекарственные препараты с другим путем введения (например, для приема внутрь в отличие от парентерального);

- лекарственные препараты, имеющие одинаковый путь введения, но в другой лекарственной форме (например, капсулы в отличие от таблеток, раствор в отличие от суспензии);

- лекарственные препараты с новыми особенными функциональными свойствами или системой доставки (например, таблетки с обычным высвобождением в отличие от таблеток с модифицированным высвобождением).

Изучение стабильности лекарственных препаратов в новых лекарственных формах осуществляется в основном так же, как для новых лекарственных препаратов.

Изучение стабильности лекарственных препаратов во время их

применения после вскрытия первичной многодозовой упаковки.

Лекарственные препараты в многодозовой упаковке после первого вскрытия системы укупоривания и последующего многократного открывания и закрывания упаковки во время применения, могут создавать риски для находящегося в них содержимого из-за микробиологической контаминации, пролиферации и/или физико-химического разложения.

Целью изучения стабильности лекарственного препарата во время его применения является установление периода, в течение которого после первого вскрытия системы укупоривания первичной многодозовой упаковки лекарственного препарата его качество будет соответствовать требованиям фармакопейной статьи или нормативной документации и его можно применять по назначению.

Полученные данные по стабильности лекарственного препарата в многодозовой упаковке во время его применения необходимы для обоснования предполагаемого срока хранения во время применения или для обоснования, почему срок хранения во время применения лекарственного препарата не устанавливается.

Испытания следует проводить, как минимум, на двух опытно-промышленных сериях, при этом, по меньшей мере, срок хранения одной из выбранных серий лекарственного препарата должен подходить к концу.

Испытания должно, насколько возможно, моделировать применение лекарственного препарата пациентом, учитывая наполнение упаковки и любые разведения или подготовку перед использованием. Через интервалы времени, сопоставимые с интервалами времени при применении, удаляют из упаковки соответствующие количества лекарственного препарата, применяя методы извлечения, используемые обычно при применении и описанные в инструкции по медицинскому применению. Отбор проб следует проводить в условиях окружающей среды, при которых лекарственный препарат применяется.

Во время испытаний лекарственный препарат следует хранить в условиях, указанных в фармакопейной статье или нормативной документации и в маркировке упаковки.

Лекарственный препарат следует контролировать на соответствие требованиям фармакопейной статьи или нормативной документации по всем показателям качества, которые подвержены изменениям при хранении во время применения лекарственного препарата (например, цвет; прозрачность; механические включения; размер частиц; количественное определение действующих веществ, антимикробных консервантов и антиоксидантов; родственные примеси и др.) с обязательным контролем на микробиологическую чистоту или стерильность.

Исследуют образцы, отобранные в начальной точке вскрытия, если возможно, в промежуточных точках контроля, а также в конечной точке предполагаемого периода применения (срока годности после вскрытия упаковки) лекарственного препарата, используя оставшееся в упаковке количество лекарственного препарата.

На сериях лекарственного препарата, исследуемых в соответствии с обязательством продолжения изучения стабильности, исследования не повторяют.

Изучение стабильности лекарственных препаратов после разведения/восстановления или подготовки к применению.

Необходимо проводить изучение стабильности лекарственных препаратов, полученных после специальной подготовки к применению путем разведения жидкого лекарственного препарата (например, в виде лекарственной формы «концентрат») или путем восстановления твердого лекарственного препарата (например, в виде лекарственной формы «таблетки», «порошки», «гранулы», «лиофилизаты»), и предназначенных для применения в течение определенного времени в виде разведенного/восстановленного лекарственного препарата.

Цель изучения стабильности разведенных/восстановленных лекарственных препаратов – определить максимальный период их применения (срок годности) после разведения/восстановления (после подготовки к применению), в течение которого качество разведенного/восстановленного лекарственного препарата будет соответствовать требованиям фармакопейной статьи или нормативной документации.

Изучению стабильности подлежат все разведенные/восстановленные лекарственные препараты, полученные с использованием всех возможных для растворения/восстановления растворителей или диспергентов, указанных в инструкции по медицинскому применению.

Условия хранения разведенного/восстановленного лекарственного препарата могут отличаться от условий хранения исходного лекарственного препарата.

Испытания следует проводить, как минимум, на двух опытно-промышленных сериях, при этом, по крайней мере, одна выбранная серия лекарственного препарата должна быть с истекающим сроком годности.

Проверку показателей на соответствие требованиям фармакопейной статьи или нормативной документации рекомендуется осуществлять в первую и последнюю временные точки предполагаемого срока годности разведенного/восстановленного лекарственного препарата.

Испытания проводят по всем показателям качества, которые подвержены изменениям в процессе хранения и обязательно включают контроль на стерильность или микробиологическую чистоту.

Условия и период хранения (срок годности) отдельных категорий *стерильных лекарственных препаратов* после первого вскрытия упаковки, разведении/восстановления содержимого и, если допустимо, хранения лекарственного препарата до введения пациенту, зависят от наличия консервантов в составе препарата и условий введения.

Стерильные лекарственные препараты на водной основе, не содержащие консервантов, как правило, должны вводиться сразу после разведения/восстановления. При наличии особых указаний в инструкции по медицинскому применению, например, об асептическом способе разведения/восстановления, может допускаться определенный период хранения указанных лекарственных препаратов, при этом он должен быть обоснован предоставлением соответствующих данных.

Изучение стабильности необходимо проводить также для стерильных лекарственных препаратов на водной основе, содержащих антимикробные консерванты, а также неводных препаратов, например, масляных, если в инструкции по медицинскому применению указан максимально допустимый период применения и условия хранения лекарственного препарата после вскрытия.

Особенности изучения стабильности лекарственных средств растительного происхождения

Под термином «Лекарственное средство растительного происхождения», используемого только для данного раздела общей фармакопейной статьи, подразумеваются лекарственные средства, представляющие собой фармацевтические субстанции растительного происхождения, в том числе, стандартизованное лекарственное растительное сырье, экстракты, настойки, масла растительные жирные, масла эфирные, соки выжатые и т.д., а также лекарственные препараты, полученные на их основе.

Для изучения стабильности лекарственных средств растительного происхождения необходимо использовать данные долгосрочных испытаний, охватывающие весь период предполагаемого срока годности.

При изучении стабильности лекарственных средств растительного происхождения следует, используя соответствующий валидированный метод анализа, исследовать изменение содержания основного показателя, то есть изменение содержания биологически активных действующих веществ.

Вместе с тем, следует изучить, насколько это возможно, изменение содержания других веществ, присутствующих в лекарственном средстве растительного происхождения.

Если лекарственное средство растительного происхождения содержит комбинацию нескольких видов действующих веществ растительного происхождения и возможность изучения стабильности каждого активного действующего вещества отсутствует, то определять стабильность лекарственного средства растительного происхождения можно с помощью набора соответствующих методов, таких как, хроматограмм «отпечатков пальца», определение содержания, определение физических параметров, органолептические испытания или других подходящих методов. Уместность используемого аналитического метода должна быть обоснована.

Если это обосновано, при исследовании стабильности отклонение содержания активного действующего вещества в лекарственном средстве растительного происхождения от заявленного, не должно быть больше, чем:

± 5% у известного активного компонента (в случае, если компонент с известной терапевтической активностью известен),

± 10% у маркера (в случае, если компоненты с известной терапевтической активностью неизвестны).

В случае лекарственных средств растительного происхождения, содержащих витамины и/или минералы, стабильность витаминов и/или минералов должна быть продемонстрирована.

При изучении стабильности лекарственных средств растительного происхождения применимы общие требования к выбору серий, периодичности испытаний, условиям хранения.

Вместе с тем, для существующих лекарственных средств растительного происхождения, относительно которых имеются данные по стабильности за определенный период, при наличии обоснования, частота испытаний может быть уменьшена.

При выборе условий хранения при изучении стабильности

существующего лекарственного средства растительного происхождения, которое предполагается хранить при температуре не выше +25 °С (общий случай), ускоренные и промежуточные испытания могут не проводиться, если это будет обосновано, и если в маркировке будут четко указаны условия хранения при температуре не выше +25 °С.

Особенности изучения стабильности гомеопатических лекарственных средств

Для изучения стабильности гомеопатических лекарственных средств необходимо использовать данные долгосрочных испытаний, охватывающие весь период предполагаемого срока годности гомеопатического лекарственного средства.

Выбор показателей качества и методов анализа при изучении стабильности гомеопатических лекарственных средств определяется специфическими свойствами его активного действующего компонента. Действующее вещество/компонент гомеопатического лекарственного средства может быть различного происхождения: биологического, растительного, минерального, синтетического.

При изучении стабильности гомеопатических лекарственных средств следует руководствоваться общими требованиями и учитывать особенности изучения стабильности биологических лекарственных средств, лекарственных растительных препаратов, лекарственных средств химического, минерального происхождения и др.

Оценка данных по стабильности при установлении срока годности (периода до проведения повторных испытаний) лекарственных средств

Срок годности (период до проведения повторных испытаний) устанавливается на основании экспериментально полученных данных при изучении стабильности, как минимум, трех серий лекарственного средства в течение определенного периода времени в установленных оптимальных

условиях хранения и рекомендованной надлежащей упаковке.

Экспериментально установленный срок годности (период до проведения повторных испытаний) будет применим для всех серий, которые будут впоследствии произведены и упакованы при одинаковых условиях. Степень вариабельности отдельных серий должна обеспечивать уверенность в том, что произведенные впоследствии промышленные серии лекарственного средства будут соответствовать требованиям спецификации в течение установленного срока годности (периода до проведения повторных испытаний).

Производитель (разработчик) лекарственного средства определяет предполагаемый (предварительный, первоначальный) срок годности (предполагаемый период до проведения повторных испытаний) лекарственного средства – срок годности (период до проведения повторных испытаний), установленный временно на основании приемлемых результатов ускоренных испытаний и имеющихся данных долгосрочных испытаний лекарственного средства в упаковке, предназначенной для реализации.

Срок годности лекарственных препаратов устанавливают независимо от сроков годности фармацевтических субстанций. Однако для лекарственных препаратов, произведенных путем фасовки фармацевтических субстанций, следует учитывать, что стабильность лекарственных препаратов может зависеть от остаточного срока годности используемой фармацевтической субстанции.

Под остаточным сроком годности подразумевается период времени, оставшийся до окончания установленного срока годности лекарственного средства.

Также необходимо учитывать и оценивать влияние на стабильность лекарственных препаратов факторов длительности и условий хранения нерасфасованной и промежуточной продукции до передачи с одного производственного участка на другой или на участок упаковки.

Оценка данных по стабильности при установлении срока годности

(периода до проведения повторных испытаний) лекарственного средства, включает, в зависимости от ситуации, результаты физических, химических, физико-химических, биологических и микробиологических испытаний, а также специфических характеристик лекарственной формы (например, время растворения твердых лекарственных форм для применения внутрь и др.).

Допускается не включать в планы исследования стабильности лекарственного средства испытания по показателям, которые не изменяются в процессе хранения, а также испытания по показателям, изменения которых в процессе хранения не происходят в сторону ухудшения качества лекарственного средства.

Вместе с тем, для некоторых лекарственных препаратов в таких лекарственных формах, как растворы, суспензии, эмульсии и др., при необходимости должны быть проведены исследования по изучению влияния на их стабильность отрицательных температур (циклы замораживания и оттаивания).

Важно, чтобы лекарственное средство было разработано и производилось таким образом, чтобы количество действующего вещества на момент выпуска серии составляло 100 % от указанного на этикетке. Если результаты количественного определения на момент выпуска серии превышают 100 % от указанного на этикетке значения, то предполагаемый срок годности (предполагаемый период до проведения повторных испытаний) может быть завышен. С другой стороны, если результаты количественного определения на момент выпуска серии ниже 100 % от указанного на этикетке значения, количество действующего вещества может оказаться меньше нижнего критерия приемлемости еще до окончания предполагаемого срока годности (предполагаемого периода до проведения повторных испытаний).

Если данные испытаний стабильности свидетельствуют о настолько незначительном разложении и настолько низкой вариабельности, что уже при их рассмотрении очевидно, что предполагаемый срок годности

(предполагаемый период до проведения повторных испытаний) будет утвержден, то, как правило, нет необходимости в проведении формального статистического анализа; достаточно обосновать отсутствие такого анализа.

Приемлемый подход к оценке данных при установлении срока годности (периода до проведения повторных испытаний) заключается в проведении анализа относительно количественного показателя (например, количественного содержания, содержания продуктов разложения), посредством определения самого раннего момента времени, при котором усредненная кривая разложения (при доверительной вероятности 95 %) пересекается с допустимым нижним критерием приемлемости, установленным в спецификации на выпуск.

Если известно, что значение оцениваемого показателя уменьшается во времени, то с критерием приемлемости следует сравнивать нижнее граничное значение, вычисленное с доверительной вероятностью 95 %. Если известно, что значение оцениваемого показателя увеличивается во времени, то с критерием приемлемости следует сравнивать верхнее граничное значение, вычисленное с доверительной вероятностью 95 %. Если известно, что значение оцениваемого показателя может, как увеличиваться, так и уменьшаться, или направление его изменения неизвестно, следует вычислить с доверительной вероятностью 95 % нижнее и верхнее граничные значения и сравнить их с верхним и нижним пределами критерия приемлемости.

Если анализ показывает, что вариабельность от серии к серии невелика, то можно объединить результаты для одной общей оценки, используя методы статистического анализа.

Если объединение данных нескольких серий нецелесообразно, то срок годности (период до проведения повторных испытаний) будет зависеть от минимального времени, в течение которого предполагается, что характеристики серии будут оставаться в рамках критериев приемлемости.

Характер любой взаимосвязи с разложением веществ будет определять необходимость в преобразовании данных для анализа линейной регрессии.

Как правило, взаимосвязь может быть представлена в виде линейной, квадратичной или кубической функции на арифметической или логарифмической шкале. Чтобы проверить пригодность данных, полученных в отношении каждой серии, а также, если необходимо, объединенных данных для серий, следует применять статистические методы для построения прямой и кривой разложения.

В целях увеличения предполагаемого срока годности (увеличения предполагаемого периода до проведения повторных испытаний) лекарственных средств, при наличии соответствующего обоснования, может быть проведена ограниченная экстраполяция данных, полученных при долгосрочных испытаниях, за пределы наблюдаемого диапазона.

Для лекарственных препаратов не рекомендуется устанавливать срок годности более 5 лет, даже если результаты изучения стабильности позволяют это сделать.

При любой оценке данных следует учитывать не только количественное определение лекарственного средства, но и содержание продуктов разложения, баланс масс (при необходимости) и другие подходящие характеристики.

На основании полученных результатов производитель (разработчик), изучающий стабильность лекарственного средства, определяет срок годности (период до проведения повторных испытаний) с указанием вида упаковки, требуемых условий хранения и транспортирования и вносит эти данные в регистрационные документы.

Отсчет срока годности (периода до проведения повторных испытаний) промышленной серии лекарственного средства проводят от даты выдачи разрешения на ее реализацию (даты выпуска). При нормальных обстоятельствах период до даты выдачи такого разрешения не должен превышать 30 суток от даты производства.

Если разрешение на реализацию серии лекарственного средства выдано по истечении установленных 30 суток от даты производства, то началом

отсчета срока годности лекарственного средства следует считать дату производства.

После регистрации лекарственного средства и начала промышленного выпуска производитель (разработчик) обязан продолжить работы по изучению стабильности лекарственного средства с целью подтверждения или уточнения его срока годности (периода до проведения повторных испытаний).

По мере накопления данных срок годности (период до проведения повторных испытаний) лекарственного средства может быть изменен как в сторону увеличения, так и в сторону уменьшения предварительного срока годности. Изменение срока годности (периода до проведения повторных испытаний) лекарственного средства или условий его хранения утверждается в установленном порядке на основании данных, подтверждающих обоснованность заявленных изменений.

Экстраполяция − это практика использования совокупности имеющихся данных для того, чтобы сделать предположение относительно будущих данных.

Экстраполяцию проводят с помощью статистической обработки данных. В случае если полученные данные свидетельствуют о незначительной деградации и малой вариации, статистический анализ может не проводиться.

Целесообразность использования метода экстраполяции при оценке данных по стабильности лекарственных средств зависит от объема знаний о характере изменений, включая механизм деградации лекарственного средства, пригодности данных выбранной математической модели, результатов ускоренных испытаний, размера серии, наличии соответствующих вспомогательных данных и др.

Экстраполяция может быть предложена для увеличения срока годности (увеличения периода до проведения повторных испытаний) лекарственного средства, превышающего продолжительность долгосрочных испытаний,

особенно если при ускоренных испытаниях не наблюдалось «значительного изменения». Экстраполяция должна быть проведена таким образом, чтобы увеличенный (расширенный) срок годности (увеличенный период до проведения повторных испытаний) был правомерен для произведенной в будущем серии лекарственного средства при условии, что результаты испытаний этой серии лекарственного средства будут близки к критериям приемлемости, установленным на момент выпуска.

При экстраполяции данных по стабильности предполагается, что и далее, за пределами долгосрочных испытаний (для которых имеются данные), будет сохраняться такой же характер изменения. При применении экстраполяции правильность предположения характера изменения является критической.

Используя метод экстраполяции, предполагаемый срок годности (предполагаемый период до проведения повторных испытаний) лекарственного средства может быть увеличен, но не более чем в два раза и не более чем на 12 мес по сравнению с долгосрочными испытаниями.

Если при изучении стабильности предполагается в дальнейшем применение метода экстраполяции, то при долгосрочных испытаниях должны быть проведены дополнительные исследования стабильности лекарственных средств при температурах, превышающих верхнюю заявленную температуру хранения на 5 °С и 15 °С (например, при 30 °С и при 40 °С, если заявленные условия хранения – «Хранить при температуре не выше 25 °С»). При наличии «значительных изменений» в течение шести месяцев в указанных условиях экстраполяция не допускается.

Предложенный на основании экстраполяции срок годности (период до проведения повторных испытаний) всегда должен быть подтвержден дополнительными данными долгосрочных испытаний стабильности по мере получения таких данных в течение всего заявленного срока годности (периода до проведения повторных испытаний).

Оценка данных по стабильности при декларировании условий хранения и указаний по маркировке лекарственных средств

Условия хранения лекарственного средства должны быть установлены на основании оценки данных по изучению стабильности лекарственного средства при долгосрочных испытаниях, подтвержденных результатами ускоренных испытаний и, если применимо, результатами промежуточных испытаний.

Установленные условия хранения лекарственного средства должны быть включены в фармакопейную статью или нормативную документацию, в инструкцию по медицинскому применению (для лекарственных препаратов), отображены в маркировке лекарственного средства.

Для декларирования условий хранения лекарственных средств необходимо использовать унифицированные, стандартные формулировки, при этом предложенные условия хранения должны быть достижимы на практике, чтобы потребитель мог их соблюдать.

Указание условий хранения не может быть использовано для компенсации недостаточных данных по стабильности, например, в случае отсутствия данных по ускоренным и промежуточным испытаниям.

При выборе терминов для декларирования условий хранения лекарственных средств неприемлемо использование таких формулировок, как «комнатная температура», «прохладное место», «холодное место», «условия окружающей среды». Основные рекомендуемые формулировки указаний по маркировке лекарственных средств, связанных с декларированием условий хранения, приведены в таблице 11.

Таблица 11 – Указания по маркировке лекарственных средств в зависимости от условий проведения испытаний стабильности

Условия проведения испытаний, при которых подтверждена стабильность (температура /относительная влажность)	**Указание по маркировке**	**Дополнительное указание в маркировке[1] (если необходимо)**
Долгосрочные испытания при (25±2)°С и (60±5)% и ускоренные при (40±2)°С и (75±5)%	Нет[3]	«Не хранить в холодильнике или «Не замораживать»
Долгосрочные испытания при (30±2)°С и (65±5)% и ускоренные при (40±2)°С и (75±5)%	Нет[3]	«Не хранить в холодильнике или «Не замораживать»
Долгосрочные испытания при (25±2)°С и (60±5)% и промежуточные при (30±2)°С и (60±5)% или (65±5)%	«Хранить при температуре не выше 30 °С»	««Не хранить в холодильнике или «Не замораживать»
Долгосрочные испытания при (30±2)°С и (65±5)%	«Хранить при температуре не выше 30 °С»	«Не хранить в холодильнике или «Не замораживать»»
Долгосрочные испытания при (25±2)°С и (60±5)%	«Хранить при температуре не выше 25 °С»	«Не хранить в холодильнике или «Не замораживать»»
Долгосрочные испытания (5±3) °С	«Хранить в холодильнике» или «Хранить и транспортировать в холодильнике»[2, 4]	«Не замораживать»
Ниже 0 С	«Хранить в морозильной камере» или «Хранить и транспортировать в морозильной камере»[2,5]	
Примечание. 1.В зависимости от лекарственной формы и свойств лекарственного средства может возникнуть опасность снижения качества вследствие физических изменений при воздействии низких температур. Также в некоторых случаях низкие температуры могут оказывать воздействие на упаковку. Чтобы		

обратить внимание на такую возможность, может понадобиться дополнительное указание в маркировке. 2. Должен быть указан температурный диапазон (например, «Хранить при температуре от 2 °С до 8 °С»). 3 Должно быть указание: «Не требует специальных условий хранения». 4.При принятии решения о необходимости транспортирования в холодильнике следует учитывать данные по стабильности, полученные при долгосрочных испытаниях при температуре (25±2) °С и относительной влажности (60±5)%. Такое указание следует использовать в исключительных случаях. 5.Такое указание следует использовать, только если это необходимо.

Другие указания в маркировке допускаются только в тех случаях, если этого нельзя избежать, а также, если обосновано, что приведенные в таблице 11 основные условия хранения являются неподходящими. Альтернативное предложение должно быть обосновано и подтверждено соответствующими данными.

Если необходимо, должны быть указаны специальные требования, особенно для лекарственных средств, которые нельзя замораживать или они чувствительны к температурным отклонениям. Для лекарственных средств, подлежащих хранению и/или транспортированию в холодильнике или морозильной камере, в маркировке необходимо указывать диапазон температур. Определения, характеризующие температурные режимы хранения лекарственных средств, указаны также в ОФС «Хранение лекарственных средств».

Если в ходе испытаний выявлена чувствительность лекарственного средства к воздействию влаги, то маркировка лекарственного средства должна содержать указание «Хранить в сухом месте».

Маркировка лекарственных средств, неустойчивость которых к воздействию света установлена при исследовании фотостабильности в ходе стрессовых испытаний, должна содержать указание «Хранить в защищенном от света месте».

В маркировке упаковки должна быть указана дата истечения срока годности (дата проведения повторных испытаний), установленная на основании оценки данных по стабильности.

Следует указывать период применения (срок годности) для лекарственных препаратов в многодозовой упаковке – после первого вскрытия упаковки, для разведенных и восстановленных лекарственных препаратов - после растворения/диспергирования (после подготовки к применению). Период применения лекарственного препарата и рекомендации по хранению лекарственного препарата во время применения (если необходимо) следует указывать в тексте маркировки потребительской упаковки и в инструкции по медицинскому применению.

При изучении стабильности должны быть установлены оптимальные требования к выбору упаковки, укупорочных средств и элементов упаковки (если необходимо) для конкретного лекарственного средства. Критерии выбора упаковки указаны также в ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

Лекарственное средство следует помещать в упаковку, обеспечивающую стабильность и предотвращающую снижение его качества. Указание в маркировке специальных условий хранения не следует использовать для компенсации неправильно выбранной упаковки или упаковки (укупорки) худшего качества. Тем не менее, чтобы подчеркнуть необходимость специальных мер предосторожности при выполнении условий хранения, в маркировке могут быть применены соответствующие указания, касающиеся использования упаковки, защищающей от факторов внешнего воздействия, например, «Хранить в плотно укупоренной упаковке», «Хранить во влагонепроницаемой упаковке», «Хранить в светозащитной упаковке» и др.

Хранение лекарственных средств **ОФС.1.1.0010.18**

Взамен ОФС.1.1.0010.15

Настоящая общая фармакопейная статья устанавливает общие требования к хранению фармацевтических субстанций, вспомогательных веществ и лекарственных препаратов и распространяется на все организации, в которых имеет место хранение лекарственных средств, с учетом вида деятельности организации.

Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов осуществляется в соответствии с ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение – процесс хранения лекарственных средств до момента их использования в пределах установленного срока годности, являющийся составной частью обращения лекарственных средств.

Общие требования к помещениям для хранения лекарственных средств и организации их хранения

Хранение лекарственных средств должно осуществляться в предназначенных для этих целей помещениях. Устройство, состав, размеры площадей помещений для хранения, их эксплуатация и оборудование должны обеспечивать надлежащие условия хранения различных групп лекарственных средств.

Комплекс помещений для хранения должен включать:

- помещение (зону) приемки, предназначенную для распаковки и приема упаковок с лекарственными средствами и их предварительного осмотра;

- помещение (зону) для отбора проб лекарственных средств в соответствии с требованиями ОФС «Отбор проб»;

- помещение (зону) для карантинного хранения лекарственных средств;

- помещения для лекарственных средств, требующих особых условий хранения;

- помещение (зону) для хранения забракованных, возвращенных, отозванных и/или лекарственных средств с истекшим сроком годности.

Указанные лекарственные средства и места их хранения должны быть четко обозначены.

Зона хранения выделяется в общем помещении для хранения при отсутствии отдельного изолированного помещения.

Отделка помещений для хранения лекарственных средств должна отвечать действующим санитарно-гигиеническим требованиям, внутренние поверхности стен и потолков должны быть гладкими, допускающими возможность проведения влажной уборки.

В каждом помещении для хранения необходимо поддерживать климатический режим, соблюдая температуру и влажность воздуха, установленные фармакопейной статьей или нормативной документацией на лекарственные средства. Необходимый воздухообмен в помещениях для хранения создается с помощью кондиционеров, приточно-вытяжной вентиляции или другого оборудования. Естественное и искусственное освещение в помещениях для хранения должно обеспечивать точное и безопасное осуществление всех выполняемых в помещении операций. При необходимости должна быть обеспечена защита лекарственных средств от солнечного излучения.

Помещения для хранения лекарственных средств должны быть оснащены необходимым количеством поверенных в установленном порядке средств измерений (термометрами, гигрометрами, психрометрами и др.) для контроля и регистрации температуры и влажности, осуществляемых не реже одного раза в сутки. Средства измерений размещаются на расстоянии не менее 3 м от дверей, окон и отопительных приборов в доступном для считывания показаний месте, на высоте 1,5–1,7 м от пола. При этом их

рекомендуется размещать в местах, где имеется наибольшая вероятность колебаний температуры и влажности или наиболее часто наблюдаются отклонения от требуемых параметров.

Регистрационные записи должны демонстрировать установленные для помещений режимы температуры и влажности, а при их несоответствии – корректирующие действия.

Помещения для хранения должны быть оборудованы достаточным количеством шкафов, сейфов, стеллажей, подтоварников, поддонов. Оборудование должно находиться в хорошем состоянии и быть чистым.

Стеллажи, шкафы и другое оборудование должно быть установлено таким образом, чтобы обеспечить доступ к лекарственным средствам, свободный проход персонала и, в случае необходимости, доступность погрузочно-разгрузочных работ, а также доступность оборудования, стен, пола помещения для уборки.

В помещениях для хранения лекарственных средств должен поддерживаться надлежащий санитарный режим. Периодичность и методы уборки помещений должны соответствовать требованиям нормативных документов. Используемые санитарно-дезинфицирующие средства должны быть безопасными, риск загрязнения этими средствами лекарственных средств, находящихся на хранении, должен быть исключен.

Должны быть разработаны специальные инструкции по уборке разлитых или рассыпанных лекарственных средств с целью полного устранения и предотвращения загрязнения других лекарственных средств.

При выполнении работ в помещениях для хранения лекарственных средств сотрудники должны носить специальную одежду и обувь, соблюдать правила личной гигиены.

В помещениях для хранения лекарственные средства размещают в соответствии с условиями хранения, указанными в фармакопейной статье или нормативной документации на лекарственные средства, с учетом их физико-химических и опасных свойств, фармакологического и

токсикологического действия, вида лекарственной формы лекарственного препарата и способа его применения, агрегатного состояния лекарственного средства. При использовании компьютерных технологий допускается размещение лекарственных средств по алфавитному принципу, по кодам.

Стеллажи, шкафы, полки, предназначенные для хранения лекарственных средств, должны быть идентифицированы. Также необходимо идентифицировать хранящиеся лекарственные средства с помощью стеллажной карты, при использовании компьютерных технологий – с помощью кодов и электронных устройств.

При ручном способе разгрузочно-погрузочных работ высота укладки лекарственных средств не должна превышать 1,5 м. При использовании механизированных устройств при проведении разгрузочно-погрузочных работ лекарственные средства должны храниться в несколько ярусов. При этом общая высота размещения лекарственных средств на стеллажах не должна превышать возможности погрузочно-разгрузочных механизмов.

Лекарственные средства в помещениях для хранения должны размещаться в шкафах, на стеллажах, подтоварниках, поддонах и др. Не допускается размещение лекарственных средств на полу без поддона. Поддоны могут располагаться на полу в один ряд или на стеллажах в несколько ярусов, в зависимости от высоты стеллажа. Не допускается размещение поддонов с лекарственными средствами в несколько рядов по высоте без использования стеллажей.

При создании условий хранения отдельно взятого лекарственного средства необходимо руководствоваться требованиями, указанными в фармакопейной статье или нормативной документации на это лекарственное средство, установленными производителем (разработчиком) лекарственного средства на основании результатов исследования стабильности в соответствии с ОФС «Стабильность и сроки годности лекарственных средств».

Хранение лекарственных средств осуществляется в упаковке (потребительской, групповой), соответствующей требованиям нормативной документации на это лекарственное средство.

Хранение лекарственных средств осуществляется при относительной влажности 60±5% в зависимости от соответствующей климатической зоны (I, II, III, IVA, IVБ), если специальные условия хранения не указаны в нормативной документации.

Лекарственные средства следует хранить так, чтобы не допустить их загрязнения, смешивания и перекрестной контаминации. Необходимо избегать посторонних запахов в помещениях для хранения.

Должна быть внедрена установленная в организации система учета лекарственных средств с ограниченным сроком годности. Если на хранении находятся нескольких серий одного наименования лекарственного средства, то для использования в первую очередь должно быть взято лекарственное средство, срок годности которого истекает раньше, чем у других.

Забракованные лекарственные средства должны быть идентифицированы и храниться в соответствующем помещении (зоне) в условиях, не допускающих их несанкционированного использования.

Особенности хранения отдельных групп лекарственных средств

Лекарственные средства, обладающие опасными свойствами (огнеопасные, взрывоопасные, радиофармацевтические, едкие, коррозионные, газы сжатые и сжиженные и др.), следует хранить в специально устроенных помещениях, оборудованных дополнительными средствами безопасности и охраны. При хранении необходимо обеспечить сохранность и заявленное качество лекарственных средств, предотвратить возможность проявления лекарственными средствами своих опасных свойств и создать безопасные условия труда сотрудников, осуществляющих работу с такими лекарственными средствами.

При устройстве помещений и организации хранения опасных лекарственных средств необходимо руководствоваться требованиями

федеральных законов и нормативных правовых актов Российской Федерации.

Хранение наркотических и психотропных лекарственных средств должно осуществляться в соответствии с федеральными законами и нормативными правовыми актами Российской Федерации.

При хранении лекарственных средств, требующих защиты от влияния факторов внешней среды (света, температуры, атмосферного состава воздуха и др.), необходимо обеспечить указанный в фармакопейной статье или нормативной документации режим хранения. Отклонения от регламентируемых условий допускаются однократно только на краткосрочный период (не более 24 ч), если при этом специальные условия, например, постоянное хранение в холодном месте, не оговорены отдельно.

Лекарственные средства, которые под действием световой энергии могут изменять свои свойства (окисляться, восстанавливаться, разлагаться, изменять свой цвет и т.п.), являются фото- или светочувствительными; лекарственные средства, устойчивые к действию света, – фотостабильными. Влияние световой энергии может проявляться в воздействии прямых солнечных лучей, рассеянного света видимой области светового спектра и излучения ультрафиолетовой области.

Маркировка светочувствительных лекарственных средств, как правило, содержит указание: «Хранить в защищенном от света месте». Лекарственные средства, требующие защиты от действия света, должны храниться в помещениях или специально оборудованных зонах, обеспечивающих защиту от естественного и искусственного освещения. Фармацевтические субстанции, требующие защиты от действия света, следует хранить либо в упаковке из светозащитных материалов, либо в темном помещении или шкафах. Если в качестве упаковки особо чувствительных к свету фармацевтических субстанций используется тара стеклянная для лекарственных средств, необходимо тару оклеить черной светонепроницаемой бумагой.

Светочувствительные лекарственные препараты должны быть упакованы в светозащитную вторичную (потребительскую) упаковку и/или должны храниться в защищенном от света месте.

Лекарственные средства, которые при контакте с водой, влагой могут выделять газы и т.п., являются влагочувствительными. Маркировка влагочувствительных лекарственных средств, как правило, содержит указание: «Хранить в сухом месте». При хранении таких лекарственных средств необходимо создать условия, чтобы относительная влажность воздуха не превышала 50 % при комнатной температуре (при нормальных условиях хранения) или эквивалентном давлении паров при другой температуре. Выполнение требования также предусматривает хранение влагочувствительного лекарственного средства в воздухонепроницаемой (влагонепроницаемой) потребительской упаковке, обеспечивающей указанную защиту и соблюдение условий хранения при обращении лекарственного средства.

Для поддержания низкого содержания влаги при хранении лекарственных средств в установленных случаях используют осушающие вещества при условии исключения их прямого контакта с лекарственным средством.

Лекарственные средства с гигроскопическими свойствами необходимо хранить при относительной влажности не более 50 % в упаковке, представляющей собой тару стеклянную для лекарственных средств, герметично укупоренную, или в упаковке с дополнительной защитой, например, в мешке из полиэтиленовой пленки, в соответствии с требованиями фармакопейной статьи или нормативной документации.

Некоторые группы лекарственных средств изменяют свои свойства под влиянием газов атмосферного воздуха, таких как кислород или углерода диоксид. Для обеспечения защиты лекарственных средств от воздействия газов хранение лекарственных средств рекомендуется осуществлять в

герметичной упаковке из материалов, не проницаемых для газов. Упаковка, по возможности, должна быть заполнена доверху и укупорена герметично.

Лекарственные средства, представляющие собой собственно летучие лекарственные средства или лекарственные средства, содержащие летучий растворитель; растворы и смеси летучих веществ; лекарственные средства, разлагающиеся с образованием летучих продуктов, требуют создания условий хранения, защищающих их от улетучивания и высыхания. Рекомендуется хранить лекарственные средства в прохладном месте, в герметически укупоренной упаковке из непроницаемых для улетучивающихся веществ материалов или в первичной и вторичной (потребительской) упаковке в соответствии с требованиями, указанными в фармакопейной статье или нормативной документации.

Лекарственные средства, представляющие собой фармацевтические субстанции, содержащие кристаллизационную воду (кристаллогидраты), проявляют свойства гигроскопичных веществ. Хранение кристаллогидратов рекомендуется осуществлять в герметично укупоренной упаковке в соответствии с требованиями, указанными в фармакопейной статье или нормативной документации.

Лекарственные средства, изменяющие свои свойства под действием температуры окружающей среды, являются термочувствительными. Лекарственные средства могут изменять свои свойства под воздействием комнатной и более высокой температуры или под воздействием пониженной температуры, в том числе при замораживании.

При хранении термочувствительных лекарственных средств необходимо обеспечить температурный режим, регламентированный требованиями фармакопейной статьи или нормативной документации, указанный на первичной и/или на вторичной (потребительской) упаковке лекарственного средства.

Термочувствительные лабильные лекарственные средства следует хранить в специально оборудованных помещениях (холодильных камерах)

или в помещениях для хранения, оснащенных достаточным количеством холодильных шкафов, холодильников. Для хранения термочувствительных (термолабильных) лекарственных средств также могут использоваться фармацевтические холодильники или холодильники для крови и ее препаратов.

Допускается хранение термочувствительных (термолабильных) препаратов в объемах «балк-контейнер» и «паллета» в промышленных холодильниках.

Надлежащее качество иммунобиологических лекарственных средств, безопасность и эффективность их применения обеспечивается системой «холодовой цепи», которая должна выполняться на всех четырех ее уровнях.

В холодильниках (камерах, шкафах) должна быть установлена температура, соответствующая температурному режиму хранения находящихся в них лекарственных средств. Хранение иммунобиологических лекарственных препаратов должно осуществляться при температуре не выше 8 °С. К каждой упаковке иммунобиологического лекарственного препарата в холодильнике должен быть обеспечен доступ охлажденного воздуха. Не допускается совместное хранение в холодильнике иммунобиологических лекарственных препаратов с другими лекарственными средствами.

Для мониторинга температурного режима хранения термолабильных лекарственных средств все холодильники (камеры, шкафы) должны быть обеспечены термометрами.

Непрерывный контроль температурного режима при хранении термочувствительных (термолабильных) лекарственных средств в холодильных камерах, шкафах, холодильниках осуществляют с помощью термографов и терморегистраторов, показания которых, в случае иммунобиологических лекарственных препаратов, регистрируют не реже двух раз в сутки.

Температурный режим на полках холодильника различен: температура ниже возле морозильной камеры, выше – возле открываемой дверной панели.

Обеспечение холодного места подразумевает хранение лекарственных средств в холодильнике при температуре от 2 до 8 °С, не допуская замораживания. Хранение в прохладном месте подразумевает хранение лекарственных средств при температуре от 8 до 15 °С. В этом случае допускается хранение лекарственных средств в холодильнике, за исключением лекарственных средств, которые при хранении в условиях температурного режима холодильника ниже 8 °С могут изменить свои физико-химические характеристики, например, настойки, жидкие экстракты и др. Хранение при комнатной температуре подразумевает температурный режим от 15 до 25 °С или, в зависимости от климатических условий, до 30 °С. Хранение в морозильной камере обеспечивает температурный режим лекарственных средств от −5 до −18 °С. Хранение в условиях глубокого замораживания предусматривает температурный режим ниже −18 °С.

Лекарственные средства целесообразно размещать в зонах и на полках холодильника, соответствующих их температурному режиму хранения. Не допускается хранение иммунобиологических лекарственных препаратов на дверной панели холодильника.

В помещениях для хранения необходимо обеспечить условия хранения лекарственных средств, требующих защиты от воздействия пониженной температуры, для которых в фармакопейной статье или нормативной документации установлен нижний предел температурного режима хранения.

Не допускается подвергать замораживанию лекарственные средства, имеющие соответствующие требования в фармакопейной статье или нормативной документации и указанные на первичной или вторичной упаковке, в том числе препараты инсулина, адсорбированные иммунобиологические препараты и др.

Не допускается подвергать замораживанию лекарственные средства, помещенные в упаковку, способную разрушаться при замораживании, например, лекарственные препараты в ампулах, стеклянных флаконах и др.

Используемые в фармакопее определения, характеризующие температурные режимы хранения лекарственных средств, приведены в таблице.

Необходимо обеспечить соблюдение условий хранения лекарственных средств и сохранения их целостности при транспортировании.

Для лекарственных средств, особо чувствительных к изменению температурного режима (вакцины, сыворотки и другие иммунобиологические лекарственные препараты, лекарственные препарат инсулина и др.), при транспортировании должен соблюдаться регламентируемый фармакопейной статьей или нормативной документацией температурный режим.

Таблица – Определения, характеризующие режимы хранения лекарственных средств

Режим хранения	**Температурный интервал, °С**
Хранить при температуре не выше 30 °С	от 2 до 30 °С
Хранить при температуре не выше 25 °С	от 2 до 25 °С
Хранить при температуре не выше 15 °С	от 2 до 15 °С
Хранить при температуре не выше 8 °С	от 2 до 8 °С
Хранить при температуре не ниже 8 °С	от 8 до 25 °С
Хранить при температуре от 15 до 25 °С	от 15 до 25 °С
Хранить при температуре от 8 до 15 °С	от 8 до 15 °С
Хранить при температуре от –5 до –18 °С	от –5 до –18 °С
Хранить при температуре ниже –18 °С	от –18 °С
Не требует специальных условий хранения	от 15 до 25 °С без требований к свето- и влагозащитной упаковке
Не замораживать	Не ниже +2 °С, если иное не указано в фармакопейной статье или нормативной документации

Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов	**ОФС.1.1.0011.15** **Взамен ст. ГФ XI, вып.1**

Настоящая общая фармакопейная статья устанавливает требования к условиям хранения лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов.

Условия хранения лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов в складских помещениях должны обеспечивать сохранность сырья и препаратов по показателям качества, которые могут изменяться в процессе хранения в течение установленных в фармакопейных статьях или нормативной документации сроков.

Лекарственное растительное сырье должно храниться в специально оборудованных складских помещениях, имеющих ряд зон: приемное отделение для оформления документов, проверки качества упаковки и маркировки, отбора проб для анализа; помещение для временного хранения лекарственного растительного сырья, зараженного вредителями запасов (изолятор); зону для временного хранения нестандартного сырья; зону для основного хранения сырья; зоны для раздельного хранения различных групп лекарственного растительного сырья и др.

Складские помещения для хранения лекарственных растительных препаратов должны отвечать требованиям, установленным в соответствующем порядке.

Лекарственное растительное сырье и лекарственные растительные препараты должны храниться таким образом, чтобы избежать перекрестной контаминации.

Помещения для хранения лекарственного растительного сырья и

лекарственных растительных препаратов должны быть чистыми и хорошо проветриваемыми, и, при необходимости, подвергаться дезинфекции, должны быть защищены от проникновения в них насекомых и животных, особенно грызунов.

Особое внимание должно быть уделено чистоте и надлежащему обслуживанию зон хранения, особенно там, где образуется пыль.

Если для хранения лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов требуются особые условия в отношении влажности, температуры и защиты от света, такие условия необходимо обеспечивать и контролировать.

Для контроля температуры и влажности в помещениях для хранения лекарственного растительного сырья должны быть предусмотрены соответствующие средства измерения (например, термометр и психрометр, термогигрометр и др.).

Лекарственное растительное сырье, требующее хранения при температуре, отличной от комнатной, должны иметь соответствующую маркировку.

Лекарственное растительное сырье и лекарственные растительные препараты не должны подвергаться длительному воздействию прямого или яркого рассеянного солнечного света. Лекарственные растительные средства, требующие защиты от света, должны храниться в защищенном от света месте и/или в светозащитной упаковке в соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Лекарственное растительное сырье и лекарственные растительные препараты следует хранить при относительной влажности воздуха не более 60 ± 5 % в зависимости от соответствующей климатической зоны (I, II, III и IVA) и физико-химических свойств лекарственного растительного сырья/препарата и биологически активных веществ, входящих в его состав, в упакованном виде в соответствии с ОФС «Упаковка, маркировка и

транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Основная масса лекарственного растительного сырья хранится в зонах для основного хранения сырья. Изолированно от других видов сырья следует хранить:

– плоды и семена в отдельной зоне для хранения;

– эфирномасличное сырье, обладающее запахом, в хорошо укупоренной таре (в том числе плотно укупоренные мешки, тюки, кипы тканевые);

– ядовитое и сильнодействующее сырье (в отдельном помещении или в отдельном шкафу под замком).

Хранение лекарственного растительного сырья, содержащего сердечные гликозиды, осуществляется с соблюдением требований ГФ, в частности, требований о повторном контроле на биологическую активность.

Упакованное лекарственное растительное сырье хранят в штабелях (с использованием поддонов), на стеллажах, в интейнерах (контейнерах стеллажного типа).

На каждый штабель или интейнер прикрепляется этикетка с указанием:

– наименования сырья;

– названия поставщика/заготовителя;

– номера партии/серии;

– года и месяца сбора/заготовки;

– даты поступления;

– срока хранения.

Лекарственное растительное сырье должно храниться таким образом, чтобы не препятствовать свободной циркуляции воздуха в помещении.

Лекарственное растительное сырье при хранении необходимо ежегодно перекладывать, обращая внимание на наличие вредителей запасов и на

соответствие длительности хранения сроку годности, указанному в фармакопейной статье или нормативной документации.

Лекарственные растительные препараты должны храниться в упаковке в соответствии с требованиями фармакопейных статей или нормативной документации с соблюдением условий, указанных в маркировке. Вторичная (и/или первичная) упаковка и (или) транспортная тара лекарственных растительных препаратов должна обеспечивать защиту от воздействия влаги и солнечного света.

Лекарственные растительные препараты следует хранить на стеллажах или в шкафах.

Лекарственное растительное сырье и лекарственные растительные препараты должны подвергаться ежегодному контролю на соответствие требованиям фармакопейных статей или нормативной документации по показателям качества, которые могут изменяться в процессе хранения. По результатам проверки лекарственное растительное сырье и лекарственные растительные препараты, не соответствующее требованиям фармакопейных статей или нормативной документации, бракуют.

Валидация аналитических методик	**ОФС.1.1.0012.15** **Вводится впервые**

Валидация аналитической методики – это экспериментальное доказательство того, что методика пригодна для решения предполагаемых задач.

Настоящая общая фармакопейная статья регламентирует характеристики аналитических методик, определяемые с целью их валидации, и соответствующие критерии пригодности валидируемых методик, предназначенных для контроля качества лекарственных средств: фармацевтических субстанций и лекарственных препаратов.

Валидации подлежат методики количественного определения, в том числе методики определения примесей и методики определения предела содержания. Методики проверки подлинности подвергаются валидации при необходимости подтвердить их специфичность.

При валидации проводится оценка аналитической методики по перечисленным ниже характеристикам, выбираемым с учетом типовых рекомендаций, приведенных в таблице:

– специфичности (specificity);

– пределу обнаружения (detection limit);

– пределу количественного определения (quantitation limit);

– аналитической области (range);

– линейности (linearity);

– правильности (trueness);

– прецизионности (precision);

– устойчивости (robustness).

Таблица 1 – Характеристики методик, определяемые при валидации

Наименование характеристики	**Основные типы методик**				
	Испытание на подлинность	**Посторонние примеси**		**Количественное определение**	
		Количественные методики	**Предел содержания**	**Основного действующего вещества, нормируемых компонентов**	**Действующего вещества в тесте «Растворение»**
Специфичность**)	Да	Да	Да	Да	Да
Предел обнаружения	Нет	Нет	Да	Нет	Нет
Предел количественного определения	Нет	Да	Нет	Нет	Нет
Аналитическая область	Нет	Да	Нет	Да	Да
Линейность	Нет	Да	Нет	Да	Да
Правильность	Нет	Да	*	Да	Да
Прецизионность: – повторяемость (сходимость)	Нет	Да	Нет	Да	Да
– промежуточная (внутрилабораторная) прецизионность	Нет	Да	Нет	Да	Нет
Устойчивость	Нет	*	*	*	*

*) может определяться при необходимости;

**) отсутствие специфичности одной аналитической методики может быть компенсировано использованием другой аналитической методики.

Ревалидацию (повторную валидацию) методик проводят при изменении:

–технологии получения объекта анализа;

–состава лекарственного средства (объекта анализа);

–ранее утвержденной методики анализа.

1. СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Специфичность – это способность аналитической методики однозначно оценивать определяемое вещество в присутствии сопутствующих компонентов.

Доказательство специфичности валидируемой методики обычно

основывается на рассмотрении полученных с ее использованием данных анализа модельных смесей известного состава.

Специфичность валидируемой методики может быть доказана также соответствующей статистической обработкой результатов анализов реальных объектов, выполненных с ее использованием и, параллельно, с использованием другой, заведомо специфичной, методики (методики, специфичность которой доказана).

1.1 Для методик испытаний на подлинность

Валидируемая методика (или совокупность методик) должна обеспечивать достоверную информацию о присутствии данного действующего вещества в субстанции или лекарственной форме при наличии в ее составе предусмотренных рецептурой компонентов, что подлежит экспериментальному подтверждению.

Подлинность действующего вещества в фармацевтической субстанции или лекарственном препарате устанавливают в сравнении со стандартным образцом или по физико-химическим или химическим свойствам, не характерным для других компонентов.

1.2 Для методик количественного определения и испытания на примеси

Для валидируемой методики количественного определения и испытаний на примеси применяют одинаковые подходы − должна быть оценена ее специфичность в отношении определяемого вещества, т. е. должно быть экспериментально подтверждено, что присутствие сопутствующих компонентов не влияет непредусмотренным образом на результат анализа.

Допускается оценка специфичности валидируемой методики как путем анализа модельных смесей известного состава, содержащих определяемое вещество, так и путем сравнения результатов анализов реальных объектов, полученных одновременно с использованием валидируемой и другой,

заведомо специфичной методики. Результаты соответствующих экспериментов должны быть статистически обработаны.

Недостаток специфичности испытания может быть компенсирован другим (другими) дополнительным испытанием.

При валидации методик, если это целесообразно, могут использоваться образцы лекарственных средств, подвергнутые, с целью накопления в них примесей, воздействию экстремальных условий (света, температуры, влажности) или химически модифицированные любым подходящим способом.

Для хроматографических методик показывают разрешение между двумя наиболее близко элюирующимися веществами при соответствующих концентрациях.

2. ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

Предел обнаружения – это наименьшее количество (концентрация) определяемого вещества в образце, которое может быть обнаружено (или приближенно оценено) с использованием валидируемой методики.

Предел обнаружения в случаях, указанных в таблице, обычно выражается как концентрация определяемого вещества (в % относительных или долях на миллион – ppm).

В зависимости от типа методики (визуальная или инструментальная) используют разные способы определения предела обнаружения.

2.1 Для методик с визуальной оценкой результата анализа

Проводят испытания образцов с различными известными количествами (концентрациями) определяемого вещества и устанавливают минимальное значение, при котором результат анализа может быть оценен визуально. Это значение является оценкой предела обнаружения.

2.2 Для методик с инструментальной оценкой результата анализа

2.2.1 По соотношению сигнал/шум

Этот подход применим к методам, для которых наблюдается шум базовой линии. Сравнивают величины сигналов, полученных для контрольного опыта и для образцов с низкими концентрациями анализируемого вещества. Устанавливают минимальное количество (концентрацию) определяемого вещества в образце, при котором величина отношения аналитического сигнала к уровню шумов равна 3.

Найденная величина является оценкой предела обнаружения.

2.2.2 По величине стандартного отклонения сигнала и угловому коэффициенту калибровочного графика

Предел обнаружения (ПО) находят по уравнению:

$$ПО = 3{,}3 \cdot S/b,$$

где S – стандартное отклонение аналитического сигнала;

b – коэффициент чувствительности, представляющий собой отношение аналитического сигнала к определяемой величине (тангенс угла наклона калибровочной кривой).

При наличии экспериментальных данных в широком диапазоне измеряемой величины S и b могут быть оценены методом наименьших квадратов.

Для линейного калибровочного графика значение S принимают равным стандартному отклонению S_a свободного члена уравнения этого графика. Полученное значение предела обнаружения при необходимости может быть подтверждено прямым экспериментом при количествах (концентрациях) определяемого вещества, близких к найденному значению предела обнаружения.

Как правило, если имеются данные о пригодности методики для надежного определения вещества в концентрациях, лежащих как выше, так и ниже нормы его содержания, установленной спецификацией, определять реальный предел обнаружения для такой методики не требуется.

3. ПРЕДЕЛ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Предел количественного определения – это наименьшее количество (концентрация) вещества в образце, которое может быть количественно оценено с использованием валидируемой методики с требуемой правильностью и внутрилабораторной (промежуточной) прецизионностью.

Предел количественного определения является необходимой валидационной характеристикой методик, используемых для оценки малых количеств (концентраций) веществ в образце и, в частности, для оценки содержания примесей.

В зависимости от типа методики используют следующие способы нахождения предела количественного определения.

3.1 Для методик с визуальной оценкой результата анализа

Проводят испытания образцов с различными известными количествами (концентрациями) анализируемого вещества и устанавливают минимальное значение, при котором результат анализа может быть получен визуально с требуемой правильностью и внутрилабораторной (промежуточной) прецизионностью.

3.2 Для методик с инструментальной оценкой результата анализа

3.2.1 По соотношению сигнал/шум

Устанавливают минимальную концентрацию определяемого вещества в образце, при которой величина отношения аналитического сигнала к уровню шума составляет около 10:1.

3.2.2 По величине стандартного отклонения сигнала и угловому коэффициенту калибровочного графика

Предел количественного определения (ПКО) рассчитывают по уравнению:

$$ПКО = 10 \cdot S/b,$$

где S – стандартное отклонение аналитического сигнала;

b – коэффициент чувствительности, представляющий собой отношение аналитического сигнала к определяемой величине.

При наличии экспериментальных данных в широком диапазоне измеряемой величины S и b могут быть оценены методом наименьших квадратов.

Для линейного калибровочного графика значение S принимают равным стандартному отклонению S_a свободного члена уравнения этого графика. Полученное значение предела количественного определения при необходимости может быть подтверждено прямым экспериментом при количествах (концентрациях) определяемого вещества, близких к найденному значению предела количественного определения.

Если имеются данные о способности методики надежно определять анализируемое вещество в концентрации выше и ниже установленной в спецификации нормы его содержания, определять реальное значение предела количественного определения для такой методики, как правило, не требуется.

4. АНАЛИТИЧЕСКАЯ ОБЛАСТЬ МЕТОДИКИ

Аналитическая область методики – это интервал между верхним и нижним значением аналитических характеристик определяемого компонента в объекте анализа (его количества, концентрации, активности и т. п.). В этом интервале результаты, получаемые с использованием валидируемой методики, должны иметь приемлемый уровень правильности и внутрилабораторной (промежуточной) прецизионности.

К величине аналитической области методик предъявляются следующие требования:

– методики количественного определения должны быть применимы в интервале от 80 до 120 % от номинального значения определяемой аналитической характеристики;

– методики оценки однородности дозирования должны быть применимы в интервале от 70 до 130 % от номинальной дозы;

– методики количественного определения, используемые при проведении теста «Растворение», обычно должны быть применимы в

пределах от 50 до 120 % от ожидаемой концентрации действующего вещества в среде растворения;

– методики испытаний на чистоту должны быть применимы в интервале от «Предела количественного определения» или «Предела обнаружения» до 120 % от допустимого содержания определяемой примеси.

Аналитическая область методики может быть установлена по диапазону экспериментальных данных, удовлетворяющих линейной модели.

5. ЛИНЕЙНОСТЬ

Линейность методики – это наличие линейной зависимости аналитического сигнала от концентрации или количества определяемого вещества в анализируемой пробе в пределах аналитической области методики.

При валидации методики ее линейность в аналитической области проверяют экспериментально измерением аналитических сигналов для не менее чем 5 проб с различными количествами или концентрациями определяемого вещества. Экспериментальные данные обрабатывают методом наименьших квадратов с использованием линейной модели:

$$y = b \cdot x + a,$$

где x – количество или концентрация определяемого вещества;

y – величина отклика;

b – угловой коэффициент;

a – свободный член (ОФС «Статистическая обработка результатов химического эксперимента»).

Должны быть рассчитаны и представлены величины b, a и коэффициент корреляции r. В большинстве случаев используют линейные зависимости, отвечающие условию $|r| \geq 0{,}99$, и только при анализе следовых количеств рассматривают линейные зависимости, для которых $|r| \geq 0{,}9$.

В отдельных случаях возможность линейной аппроксимации экспериментальных данных обеспечивается лишь после их математического преобразования (например, логарифмирования).

Для некоторых методик анализа, в основу которых в принципе не может быть положена линейная зависимость между экспериментальными данными, определение концентрации или количества вещества проводят с использованием нелинейных калибровочных графиков. При этом график зависимости аналитического сигнала от количества или концентрации определяемого вещества может быть аппроксимирован подходящей нелинейной функцией с использованием метода наименьших квадратов, что выполнимо при наличии соответствующего валидированного программного обеспечения.

6. ПРАВИЛЬНОСТЬ

Правильность методики характеризуется отклонением среднего результата определений, выполненных с ее использованием, от значения, принимаемого за истинное.

Валидируемая методика признается правильной, если значения, принимаемые за истинные, лежат внутри доверительных интервалов соответствующих средних результатов анализов, полученных экспериментально по данной методике.

Для оценки правильности методик количественного определения применимы следующие подходы:

а) анализ с использованием валидируемой методики стандартных образцов или модельных смесей с известным содержанием (концентрацией) определяемого вещества;

б) сравнение результатов, полученных с использованием валидируемой методики и образцовой методики, правильность которой ранее установлена;

в) рассмотрение результатов изучения линейности валидируемой методики: если свободный член в уравнении, приведенном в разделе 5,

статистически достоверно не отличается от нуля, то использование такой методики дает результаты, свободные от систематической ошибки.

Для подходов «а» и «б» возможно представление полученных данных в виде уравнения линейной зависимости (регрессии) между экспериментально найденными и истинными величинами. Для этого уравнения проверяются гипотезы о равенстве единице тангенса угла наклона *b* и о равенстве нулю свободного члена *a*. Как правило, если эти гипотезы признаются верными при степени надежности, равной 0,05, то использование валидируемой методики дает правильные, т. е. свободные от систематической ошибки, результаты.

7. ПРЕЦИЗИОННОСТЬ

Прецизионность методики характеризуется рассеянием результатов, получаемых с ее использованием, относительно величины среднего результата. Мерой такого рассеяния является величина стандартного отклонения результата отдельного определения, полученная для выборки достаточно большого объема.

Прецизионность оценивается для любой методики количественного определения по результатам не менее трех определений для каждого из трех уровней определяемых величин (нижнего, среднего и верхнего), лежащих в пределах аналитической области методики. Повторяемость также может оцениваться для любой методики количественного определения по результатам не менее шести определений для образцов с содержанием определяемого вещества, близким к номинальному. Во многих случаях оценка прецизионности может быть проведена по результатам обработки экспериментальных данных методом наименьших квадратов, как указано в ОФС «Статистическая обработка результатов химического эксперимента».

Прецизионность должна исследоваться на однородных образцах и может оцениваться в трех вариантах:

– как повторяемость (сходимость);

– как внутрилабораторная (промежуточная) прецизионность;

– как межлабораторная прецизионность (воспроизводимость).

Результаты оценки методики анализа по каждому из вариантов прецизионности обычно характеризуются соответствующим значением величины стандартного отклонения результата отдельного определения.

Обычно при разработке оригинальной методики определяется повторяемость (сходимость) результатов, получаемых с ее использованием. При необходимости включения разработанной методики в нормативную документацию дополнительно определяется ее внутрилабораторная (промежуточная) прецизионность. Межлабораторная прецизионность (воспроизводимость) методики оценивается при предполагаемом ее включении в проект общей фармакопейной статьи, фармакопейной статьи или в нормативную документацию на фармакопейные стандартные образцы.

7.1 Повторяемость (сходимость)

Повторяемость аналитической методики оценивают по независимым результатам, полученным в одинаковых регламентированных условиях в одной лаборатории (один и тот же исполнитель, одно и то же оборудование, один и тот же набор реактивов) в пределах короткого промежутка времени.

7.2 Внутрилабораторная (промежуточная) прецизионность

Внутрилабораторная (промежуточная) прецизионность валидируемой методики оценивается в условиях работы одной лаборатории (разные дни, разные исполнители, разное оборудование и т. д.).

7.3 Межлабораторная прецизионность (воспроизводимость)

Межлабораторная прецизионность (воспроизводимость) валидируемой методики оценивается при проведении испытаний в разных лабораториях.

8. УСТОЙЧИВОСТЬ

Устойчивость валидируемой методики – это способность сохранять найденные для нее в оптимальных (номинальных) условиях характеристики, приведенные в таблице, при вероятных небольших отклонениях от этих условий проведения анализа.

Устойчивость методики не следует определять по отношению к легко контролируемым условиям проведения анализа. Это резко сокращает необходимость в специальном изучении устойчивости.

Устойчивость должна изучаться только в тех случаях, когда валидируемая методика основана на использовании особо чувствительных к внешним условиям методов анализа, таких как различные виды хроматографии и функционального анализа. При необходимости оценка устойчивости методики проводится на стадии ее разработки. Если вероятна невысокая устойчивость методики, проверка ее пригодности осуществляется в обязательном порядке непосредственно в процессе практического использования.

Проверка пригодности аналитической системы

Проверка пригодности аналитической системы – это проверка выполнения основных требований, предъявляемых к ней. Система, пригодность которой проверяется, представляет собой совокупность конкретных приборов, реактивов, стандартов и анализируемых образцов. Требования к такой системе обычно конкретизированы в общей фармакопейной статье на соответствующий аналитический метод. Таким образом, проверка пригодности аналитической системы становится процедурой, включаемой в валидируемую методику.

Представление результатов валидации

Протокол валидации аналитической методики должен содержать:

– ее полное описание, достаточное для воспроизведения и отражающее все условия, необходимые для выполнения анализа;

– оцениваемые характеристики;

– все первичные результаты, которые вошли в статистическую обработку данных;

– результаты статистической обработки данных, полученных экспериментально при разработке или проверке валидируемой методики;

– иллюстративные материалы, такие как копии хроматограмм, полученных методами высокоэффективной жидкостной хроматографии или газовой хроматографии; электрофореграмм, электронных и инфракрасных спектров; фотографии или рисунки хроматограмм, полученных методами тонкослойной или бумажной хроматографии; рисунки кривых титрования, калибровочные графики;

– заключение о пригодности валидируемой методики для включения в нормативный документ.

Материалы валидации отдельных аналитических методик целесообразно оформлять в виде объединенного отчета о валидации.

Статистическая обработка результатов химического эксперимента	**ОФС.1.1.0013.15** **Взамен ст. ГФ XI, вып.1**

Требования данной общей фармакопейной статьи распространяются на методы, используемые при статистической обработке результатов химического эксперимента.

Обозначения:

A – измеряемая величина;

a – свободный член линейной зависимости;

b – угловой коэффициент линейной зависимости;

F – критерий Фишера;

f – число степеней свободы;

i – порядковый номер варианты;

L – фактор, используемый при оценке сходимости результатов параллельных определений;

m, n – объемы выборки;

$P, \overline{P}$ – доверительная вероятность соответственно при дву- и односторонней постановке задачи;

Q_1, Q_n – контрольные критерии идентификации грубых ошибок;

R – размах варьирования;

r – коэффициент корреляции;

s – стандартное отклонение;

s^2 – дисперсия;

$s_{\bar{x}}$ – стандартное отклонение среднего результата;

$s_{\bar{x},\%}$ – относительное стандартное отклонение среднего результата (коэффициент вариации);

$s_{\lg}$ – логарифмическое стандартное отклонение;

$s^2_{\lg}$ – логарифмическая дисперсия;

$s_{\lg \bar{\delta}_g}$ – логарифмическое стандартное отклонение среднего геометрического результата;

s_0^2, s_b^2, s_a^2 – общая дисперсия и дисперсия коэффициентов линейной зависимости;

t – критерий Стьюдента;

U – коэффициент для расчета границ среднего результата гарантии качества анализируемого продукта;

x, y – текущие координаты в уравнении линейной зависимости;

X_i, Y_i – вычисленные, исходя из уравнения линейной зависимости, значения переменных x и y;

$\bar{x}, \bar{y}$ – средние выборки (координаты центра линейной зависимости);

x_i, y_i – i-тая варианта (i-тая пара экспериментальных значений x и y);

$\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$ – граничные значения доверительного интервала среднего результата;

$x_i \pm \Delta x$ – граничные значения доверительного интервала результата отдельного определения;

d, Δ – разность некоторых величин;

α – уровень значимости, степень надежности;

Δx– полуширина доверительного интервала величины;

δ – относительная величина систематической ошибки;

$\varepsilon, \bar{\varepsilon}$ – относительные ошибки соответственно результата отдельного определения и среднего результата;

μ – истинное значение измеряемой величины;

$\sum$ – знак суммирования (сумма);

X^2 – критерий хи-квадрат.

Примечание. Термины доверительная вероятность P и уровень значимости (степень надежности) α взаимозаменяемы, поскольку их сумма равна либо 1, либо 100 %.

Метрологические характеристики методов и результатов, получаемых при статистической обработке данных эксперимента, позволяют проводить оценку и сравнение, как методик аналитического эксперимента, так и

исследуемых при таком эксперименте объектов, и на этой основе решать ряд прикладных задач.

1. Основные статистические характеристики однородной выборки и их вычисление

Проверка однородности выборки. Исключение выпадающих значений вариант. Термином «выборка» обозначают совокупность статистически эквивалентных найденных в эксперименте величин (вариант). В качестве такой совокупности можно, например, рассматривать ряд результатов, полученных при параллельных определениях содержания какого-либо вещества в однородной по составу пробе.

Допустим, что отдельные значения вариант выборки объема n обозначены через x_i ($1 \le i \le n$) и расположены в порядке возрастания:

$$x_1; x_2; \ldots x_i; \ldots x_{n-1}; x_n. \qquad (1.1)$$

Результаты, полученные при статистической обработке выборки, будут достоверны лишь в том случае, если эта выборка однородна, т. е. если варианты, входящие в нее, не отягощены грубыми ошибками, допущенными при измерении или расчете. Такие варианты должны быть исключены из выборки перед окончательным вычислением ее статистических характеристик. Для выборки небольшого объема ($n < 10$) идентификация вариант, отягощенных грубыми ошибками, может быть выполнена, исходя из величины размаха варьирования R, см. уравнения (1.12), (1.13). Для идентификации таких вариант в выборке большого объема ($n \ge 10$) целесообразно проводить предварительную статистическую обработку всей выборки, полагая ее однородной, и уже затем на основании найденных статистических характеристик решать вопрос о справедливости сделанного предположения об однородности, см. выражение (1.14).

В большинстве случаев среднее выборки $\bar{x}$ является наилучшей оценкой истинного значения измеряемой величины μ, если его вычисляют как среднее арифметическое всех вариант:

$$\bar{x} = \frac{\sum_1^n x_i}{n}. \qquad (1.2)$$

При этом разброс вариант x_i вокруг среднего $\bar{x}$ характеризуется величиной стандартного отклонения s. В количественном химическом анализе величина s часто рассматривается как оценка случайной ошибки, свойственной данному методу анализа. Квадрат этой величины s^2 называют дисперсией. Величина дисперсии может рассматриваться как мера воспроизводимости результатов, представленных в данной выборке. Вычисление величин (оценок) s и s^2 проводят по уравнениям (1.5) и (1.6). Иногда для этого предварительно определяют значения отклонений d_i и число степеней свободы (число независимых вариант) f:

$$d_i = x_i - \bar{x}, \qquad (1.3)$$

$$f = n - 1, \qquad (1.4)$$

$$s^2 = \frac{\sum_1^n d_i^2}{f} = \frac{\sum_1^n x_i^2 - n \cdot \bar{x}^2}{f}, \qquad (1.5)$$

$$s = \sqrt{s^2} \qquad (1.6)$$

Стандартное отклонение среднего результата $s_{\bar{x}}$ рассчитывают по уравнению:

$$s_{\bar{x}} = \frac{s}{\sqrt{n}} \qquad (1.7)$$

Отношение $s_{\bar{x}}$ к $\bar{x}$, выраженное в процентах, называют относительным стандартным отклонением среднего результата или коэффициентом вариации $s_{\bar{x}}$, %.

Примечание 1.1. При наличии ряда из g выборок с порядковыми номерами k ($1 \le k \le g$) расчет дисперсии s целесообразно проводить по формуле:

$$s^2 = \frac{\sum_{k=1}^{k=g} \sum_{i=1}^{i=n_k} d_{ik}^2}{f} = \frac{\sum_{k=1}^{k=g} \left[(n_k - 1) s_k^2 \right]}{f} = \frac{\sum_{k=1}^{k=g} \left(\sum_{i=1}^{i=n_k} x_{ik}^2 - n_k \bar{x}_k^2 \right)}{f}. \qquad (1.8)$$

При этом число степеней свободы равно:

$$f = \sum_{k=1}^{k=g} (n_k - 1), \qquad (1.9)$$

где $x_k -$ среднее k-той выборки;

$n_k -$ число вариант в k-той выборке;

$x_{ik} -$ i-тая варианта k-той выборки;

s_k^2 – дисперсия *k*-той выборки;

d_{ik} – отклонение *i*-той варианты *k*-той выборки.

Необходимым условием применения уравнений (1.8) и (1.9) является отсутствие статистически достоверной разницы между отдельными значениями s_k^2. В простейшем случае сравнение крайних значений s_k^2 проводят, исходя из величины критерия *F,* которую вычисляют по уравнению (3.4) и интерпретируют, как указано в разделе 3.

Примечание 1.2. Если при измерениях получают логарифмы искомых вариант, среднее выборки вычисляют как среднее геометрическое, используя логарифм вариант:

$$\lg \bar{x}_g = \frac{\sum_1^n \lg x_i}{n}, \qquad (1.10)$$

откуда

$$\bar{x}_g = \sqrt[n]{x_1 \cdot x_2 \cdot \ldots \cdot x_n} = \text{antilg}\,(\lg \bar{x}_g). \qquad (1.11)$$

Значения s^2, s и $s_{\bar{x}}$ в этом случае также рассчитывают, исходя из логарифмов вариант, и обозначают соответственно через $s_{\lg}^2$, $s_{\lg}$ и $s_{\lg \bar{x}_g}$.

Пример 1.1. При определении содержания стрептоцида в образце линимента были получены следующие данные:

Содержание в образце	Номер опыта *i*				
	1	2	3	4	5
x_i, %	9,52	9,55	9,83	10,12	10,33

$$n = 5; f = n - 1 = 5 - 1 = 4.$$

$$x = \frac{\sum_1^n x_i}{n} = \frac{9{,}52 + 9{,}55 + 9{,}83 + 10{,}12 + 10{,}33}{5} = 9{,}87.$$

$d_i = \left|x_i - \bar{x}\right| = \left|x_i - 9{,}87\right|$, т. е. $d_{i=1} = \left|9{,}52 - 9{,}87\right| = 0{,}35$ и т. д. до $i = 5$.

$$s^2 = \frac{\sum_1^n d_i^2}{f} = \frac{\sum_1^n x_i^2 - n\bar{x}^2}{f} = \frac{(9{,}52^2 + 9{,}55^2 + 9{,}83^2 + 10{,}12^2 + 10{,}33^2) - 5 \cdot 9{,}87^2}{4} =$$

$$= 0{,}1252;$$

$$s = \sqrt{s^2} = \sqrt{0{,}1252} = 0{,}3538;$$

$$s_{\bar{x}} = \frac{s}{\sqrt{n}} = \frac{0{,}3538}{\sqrt{5}} = 0{,}1582.$$

Как было указано выше, значения x, s^2, s и $s_{\bar{x}}$ могут быть признаны

достоверными, если ни одна из вариант выборки не отягощена грубой ошибкой, т. е. если выборка однородна. Проверка однородности выборок малого объема ($n < 10$) осуществляется без предварительного вычисления статистических характеристик, с этой целью после представления выборки в виде (1.1) для крайних вариант x_1 и x_n рассчитывают значения контрольного критерия Q, исходя из величины размаха варьирования R:

$$R = |x_1 - x_n|, \qquad (1.12)$$

$$Q_1 = \frac{|x_1 - x_2|}{R}, \qquad (1.13\ а)$$

$$Q_n = \frac{|x_n - x_{n-1}|}{R}. \qquad (1.13\ б)$$

Выборка признается неоднородной, если хотя бы одно из вычисленных значений Q превышает табличное значение Q ($\overline{P}$, n), найденное для доверительной вероятности $\overline{P}$ (см. табл. I приложения). Варианты x_1 или x_n, для которых соответствующее значение $Q > Q$ ($\overline{P}$, n), отбрасываются и для полученной выборки уменьшенного объема выполняют новый цикл вычислений по уравнениям (1.12) и (1.13) с целью проверки ее однородности. Полученная в конечном счете однородная выборка используется для вычисления x, s^2, s и $s_{\bar{x}}$.

Примечание 1.3. При $|x_1 - x_2| < |x_2 - x_3|$ и $|x_n - x_{n-1}| < |x_{n-1} - x_{n-2}|$ уравнения (1.13 а) и (1.13 б) принимают соответственно вид:

$$Q_1 = \frac{|x_2 - x_3|}{R};\ Q_n = \frac{|x_{n-1} - x_{n-2}|}{R}.$$

Пример 1.2. При проведении девяти ($n = 9$) определений содержания общего азота в плазме крови крыс были получены следующие данные (в порядке возрастания):

Содержание общего азота	Номер опыта i								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
x_i,%	0,62	0,81	0,83	0,86	0,87	0,90	0,94	0,98	0,99

По уравнениям (1.12) и (1.13 а) находим:

$$R = |x_1 - x_n| = |0{,}62 - 0{,}99| = 0{,}37;$$

$$Q_1 = \frac{|x_1 - x_2|}{R} = \frac{|0{,}62 - 0{,}81|}{0{,}37} = 0{,}51.$$

По табл. I приложения находим:

$$Q\ (9;\ 95\%) = 0{,}46 < Q_1 = 0{,}51;$$
$$Q\ (9;\ 99\%) = 0{,}55 > Q_1 = 0{,}51.$$

Следовательно, гипотеза о том, что значение $x_1 = 0{,}62$ должно быть исключено из рассматриваемой совокупности результатов измерений как отягощенное грубой ошибкой, может быть принята с доверительной вероятностью 95 %, но должна быть отвергнута, если выбранное значение доверительной вероятности равно 99 %.

Для выборок большого объема ($n \geq 10$) проверку однородности проводят после предварительного вычисления статистических характеристик $\bar{x}$, s^2, s и $s_{\bar{x}}$. При этом выборка признается однородной, если для всех вариант выполняется условие:

$$|d_i| \leq 3s. \qquad (1.14)$$

Если выборка признана неоднородной, то варианты, для которых $|d_i| > 3s$, отбрасываются как отягощенные грубыми ошибками с доверительной вероятностью $P > 99{,}0$ %. В этом случае для полученной выборки сокращенного объема повторяют цикл вычислений статистических характеристик по уравнениям (1.2), (1.5), (1.6), (1.9) и снова проводят проверку однородности. Вычисление статистических характеристик считают законченным, когда выборка сокращенного объема оказывается однородной.

Примечание 1.4. При решении вопроса об однородности конкретной выборки небольшого объема также можно воспользоваться выражением (1.14), если известна оценка величины s, ранее найденная для данного метода измерения (расчета) вариант.

2. Доверительные интервалы и оценка их величины

Если случайная однородная выборка конечного объема n получена в результате последовательных измерений некоторой величины A, имеющей истинное значение μ, то среднее этой выборки $\bar{x}$ следует рассматривать лишь как приближенную оценку величины A. Достоверность этой оценки характеризуется величиной доверительного интервала $\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$, для которой с заданной доверительной вероятностью P выполняется условие:

$$(\bar{x} - \Delta\bar{x}) \leq \mu \leq (\bar{x} + \Delta\bar{x}). \qquad (2.1)$$

Следует отметить, что данный доверительный интервал не

характеризует погрешность определения величины μ, поскольку найденная величина $\bar{x}$ может быть в действительности очень близка к истинному значению μ. Полученный доверительный интервал характеризует степень неопределенности истинного значения μ величины *A* по результатам последовательных измерений выборки конечного объема *n.* Поэтому правильно говорить о «неопределенности результатов анализа» (которая характеризуется доверительным интервалом) вместо выражения «погрешность результатов анализа», которое нередко не совсем корректно используется.

Расчет граничных значений доверительного интервала проводят по критерию Стьюдента, предполагая, что варианты, входящие в выборку, распределены нормально:

$$(\bar{x} \pm \Delta\bar{x}) = \bar{x} \pm \frac{t\,(P,f)\cdot s}{\sqrt{n}}. \qquad (2.2)$$

Здесь *t* (*P, f*) – табличное значение критерия Стьюдента (см. табл. II приложения).

Если при измерении одним и тем же методом двух близких значений *A* были получены две случайные однородные выборки с объемами *n* и *m*, то при *m* < *n* для выборки объема *m* справедливо выражение:

$$\bar{x}_{(m)} \pm \Delta\bar{x}_{(m)} = \bar{x}_{(m)} \pm \frac{t\,(P,f_n)\cdot s_n}{\sqrt{m}}, \quad (2.3)$$

где индекс указывает принадлежность величин к выборке объема *m* или *n*.

Выражение (2.3) позволяет оценить величину доверительного интервала среднего $\bar{x}_{(m)}$, найденного, исходя из выборки объема *m*. Иными словами, доверительный интервал среднего $\bar{x}_{(m)}$ для выборки относительно малого объема *m* может быть сужен благодаря использованию известных величин $s_{(n)}$ и *t* (*P*, $f_{(n)}$), найденных ранее для выборки большего объема *n* (в дальнейшем индекс *n* будет опущен).

Примечание 2.1. Если $n \le 15$, а $\frac{m+n}{n} > 1{,}5$, величины *s* и *f* целесообразно вычислять, как указано в примечании 1.1.

Подставляя *n* = 1 в выражение (2.2), или *m* = 1 в выражение (2.3), получаем:

$$x_i \pm \Delta x = x_i \pm t(P, f) \cdot s. \qquad (2.4)$$

Этот интервал является доверительным интервалом результата единичного определения. Для него с доверительной вероятностью P выполняются взаимосвязанные условия:

$$x_i - \Delta x \le \mu \le x_i + \Delta x, \qquad (2.5)$$

$$\mu - \Delta x \le x_i \le \mu + \Delta x. \qquad (2.6)$$

Значения $\Delta\bar{x}$ и Δx из выражений (2.2) и (2.4) используют при вычислении относительных погрешностей отдельной варианты (ε) и среднего результата ($\bar{\varepsilon}$), выражая эти величины в %:

$$\varepsilon = \frac{\Delta x}{x} \cdot 100\%, \quad (2.7)$$

$$\bar{\varepsilon} = \frac{\Delta \bar{x}}{\bar{x}} \cdot 100\%. \quad (2.8)$$

Пример 2.1. В результате определения содержания хинона в стандартном образце хингидрона были получены следующие данные (n = 10):

Содержание хинона	Номер опыта i									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
x_i, %	49,80	49,83	49,87	49,87	49,92	50,01	50,05	50,06	50,10	50,11

Расчеты по формулам (1.2), (1.4), (1.5), (1.6), (1.9) дали следующие результаты:

$$\bar{x} = 49{,}96;\ f = 9;\ s^2 = 0{,}01366;\ s = 0{,}1169;\ s_{\bar{x}} = 0{,}03696.$$

Доверительные интервалы результата отдельного определения и среднего результата при P = 90 % получаем согласно (2.4) и (2.2):

$$x_i \pm \Delta x = x_i \pm t(P, f) \cdot s = x_i \pm t(90\%, 9) \cdot s = x_i \pm 1{,}83 \cdot 0{,}1169 = x_i \pm 0{,}21;$$

$$\bar{x} \pm \Delta\bar{x} = \bar{x} \pm \frac{t(P, f) \cdot s}{\sqrt{n}} = 49{,}96 \pm \frac{1{,}83 \cdot 0{,}1169}{\sqrt{10}} = 49{,}96 \pm 0{,}07.$$

Тогда относительные погрешности ε и $\bar{\varepsilon}$, согласно (2.7) и (2.8), равны:

$$\varepsilon = \frac{\Delta x}{\bar{x}} \cdot 100\% = \frac{0{,}21}{49{,}96} \cdot 100\ \% = 0{,}42\ \%;$$

$$\bar{\varepsilon} = \frac{\Delta \bar{x}}{\bar{x}} \cdot 100\% = \frac{0{,}07}{49{,}96} \cdot 100\ \% = 0{,}14\ \%.$$

Обозначая истинное содержание хинона в хингидроне через μ, можно считать, что с 90 % доверительной вероятностью справедливы неравенства:

$$\mu - 0{,}21 \le x_i \le \mu + 0{,}21;$$

$$x_i - 0{,}21 \le \mu \le x_i + 0{,}21 \text{ (при любом } i);$$

$$\mu - 0{,}07 \le \bar{x} \le \mu + 0{,}07;\ \bar{x} - 0{,}07 \le \mu \le \bar{x} + 0{,}07 \text{ (при } n = 10).$$

Примечание 2.2. Вычисление доверительных интервалов для случая, описанного в примечании 1.2, проводят, исходя из логарифмов вариант.

Тогда выражения (2.2) и (2.4) принимают вид:

$$\lg \bar{x} \pm \Delta \lg \bar{x} = \lg \bar{x} \pm \frac{t(P,f) \cdot s_{\lg}}{\sqrt{n}}; \qquad (2.9)$$

$$\lg x_i \pm \Delta \lg x = \lg x_i \pm t(P,f) \cdot s_{\lg}. \qquad (2.10)$$

Потенцирование выражений (2.9) и (2.10) приводит к несимметричным доверительным интервалам для значений x и x_i.

$$\text{antilg}(\lg \bar{x} - \Delta \lg \bar{x}) \le \bar{x} \le \text{antilg}(\lg \bar{x} + \Delta \lg \bar{x}); \qquad (2.11)$$

$$\text{antilg}(\lg x_i - \Delta \lg x_i) \le x_i \le \text{antilg}(\lg x_i + \Delta \lg x_i), \qquad (2.12)$$

$$\text{где } \Delta \lg \bar{x} = \frac{t(p,f) \cdot s_{\lg}}{\sqrt{n}};$$

$$\Delta \lg x_i = t(P,f) \cdot s_{\lg}.$$

При этом для нижних и верхних границ доверительных интервалов $\bar{x}$ и x имеем:

$$\bar{\varepsilon} = \left[\frac{|\text{antilg}(\lg \bar{x} \pm \Delta \lg \bar{x}) - \bar{x}|}{\bar{x}}\right] \cdot 100\ \%; \qquad (2.12\ \text{а})$$

$$\varepsilon = \left[\frac{|\text{antilg}(\lg x_i \pm \Delta \lg x) - x_i|}{x_i}\right] \cdot 100\ \%. \qquad (2.12\ \text{б})$$

3. Метрологическая характеристика метода анализа. Сравнение двух методов анализа по воспроизводимости.

С целью получения метрологической характеристики метода проводят совместную статистическую обработку одной или нескольких выборок, полученных при анализе образцов с известным содержанием определяемого компонента μ. Результаты статистической обработки представляют в виде табл. 1.

Таблица 1 – Метрологические характеристики метода анализа

μ	f	$\bar{x}$	s^2	s	P	$T(P,f)$	Δx	ε	δ
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10*

*- Графа 10 заполняется в том случае, если реализуется неравенство (3.2).

Примечание 3.1. При проведении совместной статистической обработки нескольких выборок, полученных при анализе образцов с разным содержанием определяемого компонента μ, данные в графах 1, 2, 3, 4, 9 и 10 табл. 1 приводят отдельно для каждой выборки. При этом в графах 2, 4, 5, 7, 8 в последней строке под чертой приводят обобщенные значения f, s^2, s, t, Δx, вычисленные с учетом примечания 1.1.

Если для выборки объема m величина $|\mu - \bar{x}| > 0$, следует решить вопрос о наличии или отсутствии систематической ошибки. Для этого

вычисляют критерий Стьюдента *t*:

$$t = \frac{\left|\mu - \bar{x}\right| \cdot \sqrt{m}}{s}. \qquad (3.1)$$

Если, например, при $P = 95$ % и $f = m - 1$, реализуется неравенство

$$t > t\,(P, f), \qquad (3.2)$$

то полученные данным методом результаты отягощены систематической ошибкой, относительная величина которой δ вычисляется по формуле:

$$\delta = \frac{|\bar{x} - \mu|}{\mu} \cdot 100\ \%. \qquad (3.3)$$

Следует помнить, что если величина *A* определена как среднее $\bar{x}$ некоей выборки, полученной эталонным методом, критерий Стьюдента *t* может рассчитываться по уравнению (4.5).

При сравнении воспроизводимости двух методов анализа с оценками дисперсий s_1^2 и s_2^2 ($s_1^2 > s_2^2$) вычисляют критерий Фишера *F*:

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2}. \qquad (3.4)$$

Критерий *F* характеризует при $s_1^2 > s_2^2$ достоверность различия между s_1^2 и s_2^2. Вычисленное значение *F* сравнивают с табличным значением $F\,(P, f_1, f_2)$, найденным при $P = 99$ % (см. табл. III приложения). Если для вычисленного значения *F* выполняется неравенство:

$$F > F\,(P, f_1, f_2), \qquad (3.5)$$

различие дисперсий s_1^2 и s_2^2 признается статистически значимым с вероятностью *P*, что позволяет сделать заключение о более высокой воспроизводимости второго метода. Если выполняется неравенство:

$$F \le F\,(P, f_1, f_2), \qquad (3.5\ \text{а})$$

различие значений s_1^2 и s_2^2 не может быть признано значимым и заключение о различии воспроизводимости методов сделать нельзя ввиду недостаточного объема информации.

Примечание 3.2. Для случая, описанного в примечании 1.2, в табл. 1 вместо величин μ, $\bar{x}$, s^2 и *s* приводят величины $\lg\mu$, $\lg\bar{x}_g$, $s_{\lg}^2$ и $s_{\lg}$. При этом в графу 8, согласно примечанию 2.2, вносят величину $\Delta\lg x$, а в графу 9 – максимальное по абсолютной величине значение ε. Аналогичные замены

проводят при вычислении t по уравнению (3.1) и F – по уравнению (3.4).

Для сравнения двух методов анализа результаты статистической обработки сводят в табл.2.

Таблица 2 – Данные для сравнительной метрологической оценки двух методов анализа

Метод, № п/п	μ	f	$\bar{x}$	s^2	s	P	$t\,(P, f)$ (табл.)	Δx	ε	$t_{выч}$	$F(P,f_1,f_2)$ (табл.) при $P=99$ %	$F_{выч}$	δ	Примечания
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1														
2														

Метрологическое сравнение методов анализа желательно проводить при $\mu_1 = \mu_2$, $f_1 > 10$ и $f_2 > 10$. Если точные значения μ_1 и μ_2 неизвестны, величины δ и $t_{выч}$ не определяют.

Пример 3.1. Пусть для двух выборок аналитических данных (1 и 2), характеризующих, например, различные методы анализа, получены метрологические характеристики, приведенные в графах 1 – 10 табл. 3

Таблица 3 – Полученные данные для сравнительной метрологической оценки двух методов анализа

Номер выборки	μ	f	$\bar{x}$, %	s^2	s	P, %	$t\,(P, f)$ (табл.)	Δx	ε	$t_{выч}$	$F(P,f_1,f_2)$ (табл.) при $P=99$ %	$F_{выч}$	δ
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	100	20	100,13	0,215	0,464	95	2,09	0,97	0,97	1,28	3,36	17,92	-
2	100	15	98,01	0,012	0,110	95	2,13	0,23	0,24	72,36			1,99

Для заполнения графы 11 вычислим значения $t_{выч(1)}$ и $t_{выч(2)}$:

$$t_{выч(1)} = \frac{|\mu - \bar{x}_1|\sqrt{m_1}}{s_1} = \frac{|100 - 100{,}13| \cdot \sqrt{20+1}}{0{,}464} = 1{,}28\,;$$

$$t_{выч(2)} = \frac{|\mu - \bar{x}_2|\sqrt{m_2}}{s_2} = \frac{|100 - 98{,}01| \cdot \sqrt{15+1}}{0{,}110} = 72{,}36\,.$$

Поскольку $t_{выч(1)} = 1{,}28 < t_1$ (95 %, 20) = 2,09, гипотеза $|\mu_1 - \bar{x}_2| \neq 0$ может быть отвергнута, что позволяет считать результаты выборки 1

свободными от систематической ошибки. Напротив, поскольку $t_{выч(2)}$ = 72,36 $\gg$ t_2 (95 %, 15) = 2,13, гипотезу $|\mu_2 - \bar{x}_2| \neq 0$ приходится признать статистически достоверной, что свидетельствует о наличии систематической ошибки в результатах выборки 2. В графу 14 вносим вычисленное значение δ_2:

$$\delta_2 = \frac{|\mu_1 - \bar{x}_1|}{\mu} \cdot 100\ \% = \frac{|100 - 98{,}01|}{100} \cdot 100\ \% = 1{,}99\ \%.$$

Заполним графы 12 и 13:

$$F\ (99\ \%;\ 20;\ 15) = 3{,}36;$$

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} = \frac{0{,}215}{0{,}012} = 17{,}92;$$

$$F = 17{,}92 \gg F\ (99\ \%;\ 20;15) = 3{,}36.$$

Следовательно, при P = 99 % гипотезу о различии дисперсий s_1^2 и s_2^2 следует признать статистически достоверной.

Выводы:

а) результаты, полученные первым методом, являются правильными, т. е. они не отягощены систематической ошибкой;

б) результаты, полученные вторым методом, отягощены систематической ошибкой;

в) по воспроизводимости второй метод существенно превосходит первый метод.

4. Метрологическая характеристика среднего результата. Сравнение средних результатов двух выборок.

Если с помощью данного метода анализа (измерения) следует определить значение некоторой величины A, то для полученной экспериментально однородной выборки объема m рассчитывают значения величин, необходимые для заполнения табл. 4. Так поступают в том случае, если применяемый метод анализа (измерения) не был ранее аттестован метрологически. Если же этот метод уже имеет метрологическую аттестацию, графы 2, 4, 5, 7, 8 и 9 табл. 4 заполняются на основании данных табл. 1, полученных при его аттестации. При заполнении табл. 4 следует при необходимости учитывать примечания 2.1 и 3.1.

Таблица 4 – Метрологические характеристики среднего результата

m	f	$\bar{x}$	s^2	s	$s_{\bar{x}}$	P	$t\ (P, f)$	Δx	$\Delta\bar{x}$ или $\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$	$\bar{\varepsilon}$
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11

Таким образом, на основании выражения (2.1) для измеряемой величины A в предположении отсутствия систематической ошибки с вероятностью P выполняется условие:

$$\bar{x} - \Delta\bar{x} \le \mathrm{A} \le \bar{x} + \Delta\bar{x}, \qquad (4.1)$$

то есть величина A при отсутствии систематической ошибки лежит в пределах:

$$A = \bar{x} \pm \Delta\bar{x}. \qquad (4.2)$$

Примечание 4.1. В случае, предусмотренном в примечании 1.2, в графе 9 табл. 4 приводят величину $\Delta\lg\bar{x}$, а каждую из граф 3, 10 и 11 разбивают на две (а, б). В графе 3а приводят значение $\bar{x}_g$, в графе 3б – значение $\lg\bar{x}_g$, в графах 10а и 10б – соответственно значения нижней и верхней границ доверительного интервала для $\bar{x}_g$ (см. уравнения (2.11), (2.12)). Наконец, в графе 11 приводят максимальное по абсолютной величине значение $\bar{\varepsilon}$ (см. уравнение (2.12 а)).

Если в результате измерений одной и той же величины A получены две выборки объема n_1 и n_2, причем $\bar{x}_1 \neq \bar{x}_2$, может возникнуть необходимость проверки статистической достоверности гипотезы:

$$\bar{x}_1 = \bar{x}_2, \qquad (4.3)$$

то есть значимости величины разности $(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)$.

Такая проверка необходима, если величина A определялась двумя разными методами с целью их сравнения или если величина A определялась одним и тем же методом для двух разных объектов, идентичность которых требуется доказать. Для проверки гипотезы (4.3) следует установить, существует ли статистически значимое различие между дисперсиями s_1^2 и s_2^2. Эта проверка проводится так, как указано в разделе 3 (см. выражения (3.4), (3.5), (3.5 а)). Рассмотрим три случая.

1. Различие дисперсий s_1^2 и s_2^2 статистически недостоверно (справедливо неравенство (3.5 а)). В этом случае средневзвешенное значение s^2 вычисляют по уравнению (1.7), а дисперсию s_P^2 разности $\left|\bar{x}_1 - \bar{x}_2\right|$ – по уравнению:

$$s_{\mathrm{P}}^2 = \frac{s^2(n_1 + n_2)}{n_1 \cdot n_2}, \qquad (4.4)$$

$$s_P = \sqrt{s_P^2}\,. \qquad (4.4\text{ а})$$

Далее вычисляют критерий Стьюдента:

$$t = \frac{\left|\bar{x}_1 - \bar{x}_2\right|}{s_P} = \frac{\left|\bar{x}_1 - \bar{x}_2\right|}{s}\sqrt{\frac{n_1 n_2}{n_1 + n_2}}\,, \qquad (4.5)$$

$$\text{при } f = n_1 + n_2 - 2. \qquad (4.5\text{ а})$$

Если при выбранном значении P (например, при P = 95 %):

$$t > t\,(P, f), \qquad (4.6)$$

то результат проверки положителен – значение $(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)$ является значимым и гипотезу $\bar{x}_1 = \bar{x}_2$ отбрасывают. В противном случае надо признать, что эта гипотеза не противоречит экспериментальным данным.

2. Различие значений s_1^2 и s_2^2 статистически достоверно (справедливо неравенство (3.5)). Если $s_1^2 > s_2^2$, дисперсию s_1^2 разности $(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)$ находят по уравнению (4.7), а число степеней свободы f' – по уравнению (4.8):

$$s_P^2 = \frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}; \qquad (4.7)$$

$$f' = (n_1 + n_2 - 2)\,(0{,}5 + \frac{s_1^2 \cdot s_2^2}{s_1^4 + s_2^4}). \qquad (4.8)$$

Следовательно, в данном случае:

$$t = \frac{\left|\bar{x}_1 - \bar{x}_2\right|}{s_P} = \left|\bar{x}_1 - \bar{x}_2\right| \cdot \sqrt{\frac{n_1 n_2}{n_2 \cdot s_1^2 + n_1 \cdot s_2^2}}\,. \qquad (4.9)$$

Вычисленное по уравнению (4.9) значение t сравнивают с табличным значением $t\,(P, f')$, как это описано выше для случая 1.

Рассмотрение проблемы упрощается, когда $n_1 \approx n_2$ и $s_1^2 \gg s_2^2$. Тогда в отсутствие систематической ошибки среднее $\bar{x}_2$ выборки объема n_2 принимают за достаточно точную оценку величины A, т. е. принимают $\bar{x}_2 = \mu$. Справедливость гипотезы $\bar{x}_1 = \mu$, эквивалентной гипотезе (4.3), проверяют с помощью выражений (3.1), (3.2), принимая $f_1 = n_1 - 1$. Гипотеза (4.3) отклоняется как статистически недостоверная, если выполнятся неравенство (3.2).

3. Известно точное значение величины A. Если $A = \mu$, проверяют две

гипотезы: $\bar{x}_1 = \mu$ (4.3 а) и $\bar{x}_2 = \mu$ (4.3 б). Проверку выполняют так, как описано в разделе 3 с помощью выражений (3.1) и (3.2) отдельно для каждой из гипотез. Если гипотезы (4.3 а) и (4.3 б) статистически достоверны, то следует признать достоверной и гипотезу (4.3). В противном случае гипотеза (4.3) должна быть отброшена.

Примечание 4.2. В случае, предусмотренном примечанием 1.2, при сравнении средних используют величины $\lg \bar{x}_g, s^2_{\lg}$ и $s_{\lg}$.

Когда разность $(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)$ оказывается значимой, определяют доверительный интервал для разности соответствующих генеральных средних $\hat{x}_1$ и $\hat{x}_2$:

$$\left|\bar{x}_1 - \bar{x}_2\right| - t\,(P,f)\cdot s_P \le \left|\hat{x}_1 - \hat{x}_2\right| \le \left|\bar{x}_1 - \bar{x}_2\right| + t(P,f)\cdot s_P. \quad (4.10)$$

Пример 4.1. При определении содержания основного вещества в двух образцах препарата, изготовленных по разной технологии, получены метрологические характеристики средних результатов, приведенные в табл. 5.

Таблица 5 –Полученные данные метрологических характеристик средних результатов

Номер образца	n	f	$\bar{x}$, %	s^2	s	$s_{\bar{x}}$	P,%	$t\,(P, f)$	Δx	$\Delta\bar{x}$	$\bar{\varepsilon}$,%
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	8	7	99,10	0,25	0,50	0,18	95	2,36	1,18	0,42	0,42
2	6	5	98,33	0,31	0,56	0,23	95	2,57	1,44	0,59	0,60

Требуется решить, является ли первый образец по данному показателю лучшим в сравнении со вторым образцом. Поскольку

$$F = \frac{s_2^2}{s_1^2} = \frac{0,31}{0,25} = 1,24 < F(99\ \%,\ 5,7) = 7,46,$$

то согласно неравенству (3.5 а) статистически достоверное различие величин s_1^2 и s_2^2 отсутствует. Следовательно, гипотеза $\bar{x}_1 = \bar{x}_2$ (4.3) проверяется с помощью уравнений (1.7), (1.8), (4.4) и (4.5).

$$s = \frac{\sum_{k=1}^{k=g}\left[(n_k - 1)\cdot s_k^2\right]}{\sum_{k=1}^{k=g}(n_k - 1)} = \frac{f_1 s_1^2 + f_2 s_2^2}{f_1 + f_2} = \frac{7\cdot 0,25 + 5\cdot 0,31}{7+5} = 0,275;$$

$$s = \sqrt{s^2} = \sqrt{0,275} = 0,524.$$

$$s_P^2 = \frac{s^2(n_1 + n_2)}{n_1 \cdot n_2} = \frac{0,275(8+6)}{8\cdot 6} = 0,0802;$$

$$s_P = \sqrt{s_P^2} = \sqrt{0,0802} = 0,283.$$

$$f = n_1 + n_2 - 2 = 8 + 6 - 2 = 12.$$

$$t = \frac{\left|\bar{x}_1 - \bar{x}_2\right|}{s_P} = \frac{\left|99{,}10 - 98{,}33\right|}{0{,}283} = 2{,}72.$$

$$t = 2{,}72 > t\,(95\ \%;\ 12) = 2{,}18.$$

$$t = 2{,}72 < t\,(99\ \%;12) = 3{,}08.$$

Следовательно, с доверительной вероятностью P = 95 % гипотеза $\bar{x}_1 \neq \bar{x}_2$ может быть принята. Однако с доверительной вероятностью P = 99 % принять эту гипотезу нельзя из-за недостатка информации.

Если гипотеза $\bar{x}_1 \neq \bar{x}_2$ принята, то определяют доверительный интервал разности генеральных средних $\hat{x}_1$ и $\hat{x}_2$ (уравнение (4.10)):

$$\left|\bar{x}_1 - \bar{x}_2\right| - t(P,f)\cdot s_P \le \left|\hat{x}_1 - \hat{x}_2\right| \le \left|\bar{x}_1 - \bar{x}_2\right| + t(P,f)\cdot s_P$$

$$(P = 95\ \%;\ f = 12);$$

$$\left|99{,}10 - 98{,}33\right| - 2{,}18\cdot 0{,}283 \le \hat{x}_1 - \hat{x}_2 \le \left|99{,}10 - 98{,}33\right| + 2{,}18\cdot 0{,}283,$$

$$0{,}15 \le \hat{x}_1 - \hat{x}_2 \le 1{,}39.$$

5. Интерпретация результатов анализа

Оценка сходимости результатов параллельных определений. При рядовых исследованиях аналитик обычно проводит 2 – 3, реже 4 параллельных определения. Варианты полученной при этом упорядоченной выборки объема m, как правило, довольно значительно отличаются друг от друга. Если метод анализа метрологически аттестован, то максимальная разность результатов двух параллельных определений должна удовлетворять неравенству:

$$\left|x_1 - x_n\right| < L\,(P, m)\cdot s, \qquad (5.1)$$

где $L\,(P, m)$ – фактор, вычисленный по Пирсону при P = 95 %.

m	2	3	4
L(95 %, m)	2,77	3,31	3,65

Если неравенство (5.1) не выполняется, необходимо провести дополнительное определение и снова проверить, удовлетворяет ли величина $\left|x_1 - x_n\right|$ неравенству (5.1).

Если для результатов 4 параллельных определений неравенство (5.1) не выполняется, одна из вариант (x_1 или x_n) должна быть отброшена и заменена новой. При невозможности добиться выполнения неравенства (5.1) следует считать, что конкретные условия анализа привели к снижению

воспроизводимости метода и принятая оценка величины s применительно к данному случаю является заниженной. В этом случае поступают, как указано в разделе 1.

Определение необходимого числа параллельных определений. Если необходимо получить средний результат $\bar{x}$ с относительной погрешностью $\bar{\varepsilon} \leq \varphi$, причем метод анализа метрологически аттестован, необходимое число параллельных определений m находят учетом с уравнений (2.3) и (2.4):

$$m \geq \left(\frac{\Delta x \cdot 100}{\varphi \cdot \bar{x}} \right)^2 . \qquad (5.2)$$

Гарантия качества продукции. Предположим, что качество продукции регламентируется предельными значениями $a_{\min}$ и $a_{\max}$ величины A, которую определяют на основании результатов анализа. Примем, что вероятность соответствия качества продукта условию:

$$a_{\min} < A < a_{\max}, \qquad (5.3)$$

должна составлять $\bar{P}$ %.

Пусть величину A находят экспериментально, как среднее выборки объема m, а метод ее определения метрологически аттестован. Тогда условие (5.3) будет выполняться с вероятностью $\bar{P}$, если значение $\bar{x} = A$ будет лежать в пределах:

$$a_{\min} + \Delta\bar{A} < A < a_{\max} - \Delta\bar{A}, \qquad (5.4)$$

где:

$$\Delta\bar{A} = \frac{U(\bar{P}) \cdot s}{\sqrt{m}}. \qquad (5.5)$$

Значения коэффициента U для вероятности $\bar{P}$ = 95 % и $\bar{P}$ = 99 % соответственно равны 1,65 и 2,33. Иными словами, для гарантии качества наблюдаемые пределы изменения величины A на практике следует ограничить значениями:

$$A_{\min} = a_{\min} + \Delta\bar{A} = a_{\min} + \frac{U(\bar{P}) \cdot s}{\sqrt{m}}, \qquad (5.6)$$

$$A_{\max} = a_{\max} - \Delta\bar{A} = a_{\max} - \frac{U(\bar{P}) \cdot s}{\sqrt{m}}. \qquad (5.7)$$

Наоборот, если заданы значения $A_{\min}$ и $A_{\max}$, значения $a_{\min}$ и $a_{\max}$, входящие в неравенство (5.3), могут быть найдены путем решения уравнений (5.6) и (5.7). Наконец, если заданы пары значений $A_{\min}$, $a_{\min}$ и $A_{\max}$, $a_{\max}$, то уравнения (5.6) и (5.7) могут быть решены относительно m. Это может быть использовано для оценки необходимого числа параллельных определений величины A.

Примечание 5.1. В уравнениях (5.5), (5.6) и (5.7) величина коэффициента $U(\overline{P})$ должна быть заменена величиной t ($\overline{P}$, f), если значение f, определенное по уравнениям (1.4) или (1.8), меньше 15.

Примечание 5.2. Для случая, предусмотренного примечанием 1.2, описанные в разделе 5 вычисления проводят с использованием величин $\lg \overline{x}_g$, $\lg x_i$, $s_{\lg}$ и т. п.

Пример 5.1. Рассмотрим данные табл. 3, относящиеся к выборке 1, как метрологическую характеристику используемого метода анализа.

а) Пусть $a_{\min} = 98$ %, $a_{\max} = 100{,}50$ %. Тогда для испытуемого образца продукта средний результат анализа $\overline{A}$ при проведении трех параллельных определений ($m = 3$) должен находиться в пределах:

$$a_{\min} + \frac{U(\overline{P}) \cdot s}{\sqrt{m}} < A < a_{\max} - \frac{U(\overline{P}) \cdot s}{\sqrt{m}}.$$

При $\overline{P} = 99$ %:

$$98 + \frac{2{,}33 \cdot 0{,}464}{\sqrt{3}} < A < 100{,}5 - \frac{2{,}33 \cdot 0{,}464}{\sqrt{3}};$$

$$98{,}62 < A < 99{,}88.$$

При $\overline{P} = 95$ %:

$$98 + \frac{1{,}65 \cdot 0{,}464}{\sqrt{3}} < A < 100{,}5 - \frac{1{,}65 \cdot 0{,}464}{\sqrt{3}};$$

$$98{,}44 < A < 100{,}06.$$

б) Реальный средний результат анализа образца испытуемого продукта $A = 99$ % (при $m = 3$). Тогда определение пределов $a_{\min}$ и $a_{\max}$, гарантированно характеризующих качество данного образца с заданной доверительной вероятностью $\overline{P}$, проводим, исходя из уравнения (5.6) или (5.7), полагая

$$A_{\min} = A_{\max} = A,$$

$$a_{\min} = A - \frac{U(\overline{P}) \cdot s}{\sqrt{m}},$$

$$a_{\max} = A + \frac{U(\overline{P}) \cdot s}{\sqrt{m}}.$$

При $\overline{P} = 99$ %:

$$a_{min} = 99 - \frac{2{,}33 \cdot 0{,}464}{\sqrt{3}} = 98{,}38\ \%;$$

$$a_{max} = 99 + \frac{2{,}33 \cdot 0{,}464}{\sqrt{3}} = 99{,}62\ \%.$$

При $\overline{P} = 95$ %:

$$a_{min} = 99 - \frac{1{,}65 \cdot 0{,}464}{\sqrt{3}} = 98{,}56\ \%;$$

$$a_{max} = 99 + \frac{1{,}65 \cdot 0{,}464}{\sqrt{3}} = 99{,}44\ \%.$$

Полученные оценки $a_{\min}$ и $a_{\max}$ близки к границам доверительного интервала $A \pm \Delta\overline{x} = A \pm \frac{\Delta x}{\sqrt{m}} = 99 \pm \frac{0{,}97}{\sqrt{3}} = 99 \pm 0{,}56$, что соответствует примечанию 5.1.

6. Расчет и статистическая оценка параметров линейной зависимости (линейной регрессии)

При использовании ряда химических и физико-химических методов количественного анализа непосредственному измерению подвергается некоторая величина *y*, которая рассматривается как линейная функция искомой концентрации (количества) *x* определяемого вещества или элемента. Иными словами, в основе таких методов анализа лежит экспериментально подтвержденная линейная зависимость:

$$y = bx + a, \qquad (6.1)$$

где y – измеряемая величина;
x – концентрация (количество) определяемого вещества или элемента;
b – угловой коэффициент линейной зависимости;
a – свободный член линейной зависимости.

(Здесь *b* и *a* рассматриваются как коэффициенты (параметры) линейной регрессии *y* на *x*).

Для использования зависимости (6.1) в аналитических целях, т. е. для определения конкретной величины *x* по измеренному значению *y*, необходимо заранее найти числовые значения констант *b* и *a*, иными словами провести калибровку. Если константы зависимости (6.1) рассматриваются с учетом их физического смысла, то, при необходимости, их значения могут оцениваться с учетом доверительных интервалов.

Если калибровка проведена и значения констант a и b определены, величину X_i находят по измеренному значению y_i:

$$X_i = \frac{1}{b} y_i - \frac{a}{b}. \qquad (6.2)$$

При калибровке величину x рассматривают как аргумент, а величину y – как функцию.

Наличие линейной зависимости между x и y целесообразно подтверждать расчетным путем. Для этого по экспериментальным данным, полученным при калибровке, оценивают достоверность линейной связи между x и y с использованием корреляционного анализа и лишь затем рассчитывают значения констант a и b зависимости (6.1) и их доверительные интервалы. В первом приближении судить о достоверности линейной связи между переменными x и y можно по эмпирической величине коэффициента корреляции r, который вычисляют по уравнению:

$$r = \frac{m\sum_1^m x_i y_i - \sum_1^m x_i \sum_1^m y_i}{\sqrt{\left[m\sum_1^m x_i^2 - \left(\sum_1^m x_i\right)^2\right]\left[m\sum_1^m y_i^2 - \left(\sum_1^m y_i\right)^2\right]}}, \qquad (6.3)$$

исходя из экспериментальных данных, представленных в табл. 6. Чем ближе значение $|r|$ к единице, тем менее наблюдаемая линейная зависимость между переменными x и y может рассматриваться как случайная. В аналитической химии в большинстве случаев используют линейные зависимости, отвечающие условию $|r| \geq 0{,}98$, и только при анализе следовых количеств рассматривают линейные зависимости, для которых $|r| \geq 0{,}90$. При столь близких к 1 значениях величины $|r|$ формальное подтверждение наличия линейной связи между переменными x и y проводить не следует.

Коэффициенты a и b и метрологические характеристики зависимости (6.1) рассчитывают с использованием регрессионного анализа, т. е. методом наименьших квадратов по экспериментально измеренным значениям переменной y для заданных значений аргумента x. Пусть в результате эксперимента найдены представленные в табл. 6 пары значений аргумента x

и функции y.

Таблица 6 –Значения аргумента x и функции y.

i	x_i	y_i
1	x_1	y_1
2	x_2	y_2
…	…	…
m	x_m	y_m

Тогда:

$$b = \frac{m\sum_1^m x_i y_i - \sum_1^m x_i \sum_1^m y_i}{m\sum_1^m x_i^2 - \left(\sum_1^m x_i\right)^2}, \qquad (6.4)$$

$$a = \frac{\sum_1^m y_i - b\sum_1^m x_i}{m}, \qquad (6.5)$$

$$f = m - 2. \qquad (6.6)$$

Если полученные значения коэффициентов a и b использовать для вычисления значений y по заданным в табл. 6 значениям аргумента x согласно зависимости (6.1), то вычисленные значения y обозначают через Y_1, Y_2, ... , Y_i, ... Y_n. Разброс значений Y_i относительно значений y_i характеризуется величиной дисперсии s_0^2, которую вычисляют по уравнению:

$$s_0^2 = \frac{\sum_1^m (y_i - Y_i)^2}{f} = \frac{\sum_1^m y_i^2 - a\sum_1^m y_i - b\sum_1^m x_i y_i}{f}. \qquad (6.7)$$

В свою очередь, дисперсии констант b и a находят по уравнениям:

$$s_b^2 = \frac{m s_0^2}{m\sum_1^m x_i^2 - \left(\sum_1^m x_i\right)^2}; \qquad (6.8)$$

$$s_a^2 = \frac{s_b^2}{m}\sum_1^m x_i^2. \qquad (6.9)$$

Стандартные отклонения s_b и s_a и величины Δb и Δa, необходимые для оценки доверительных интервалов констант уравнения регрессии, рассчитывают по уравнениям:

$$s_b = \sqrt{s_b^2}\,; \tag{6.10}$$

$$s_a = \sqrt{s_a^2}\,; \tag{6.11}$$

$$\Delta b = t(P,f)\cdot s_b; \tag{6.12}$$

$$\Delta a = t(P,f)\cdot s_a. \tag{6.13}$$

Уравнению (6.1) с константами a и b обязательно удовлетворяет точка с координатами $\bar{x}$ и $\bar{y}$, называемая центром калибровочного графика:

$$\bar{x} = \frac{\sum_1^m x_i}{m}; \tag{6.14}$$

$$\bar{y} = \frac{\sum_1^m y_i}{m}. \tag{6.15}$$

Наименьшие отклонения значений y_i от значений Y_i наблюдаются в окрестностях центра графика. Стандартные отклонения s_y и s_x величин Y и X, рассчитанных соответственно по уравнениям (6.1) и (6.2), исходя соответственно из известных значений x и y, определяются с учетом удаления последних от центра графика:

$$s_y = \sqrt{s_0^2\left[\frac{1}{m} + \frac{m\left(x-\bar{x}\right)^2}{b^2\left[m\sum_1^m x_i^2 - \left(\sum_1^m x_i\right)^2\right]}\right]}; \tag{6.16}$$

$$s_x = \sqrt{\frac{s_0^2}{b^2}\left[\frac{1}{n_j} + \frac{1}{m} + \frac{m\left(\bar{y}_j-\bar{y}\right)^2}{b^2\left[m\sum_1^m x_i^2 - \left(\sum_1^m x_i\right)^2\right]}\right]}, \tag{6.17}$$

где $\bar{y}_j$ – среднее значение для n_j вариант y, по которым вычислено искомое значение X.

При $x = \bar{x}$ и $\bar{y}_j = \bar{y}$ выражения (6.16) и (6.17) принимают вид:

$$s_y = \sqrt{\frac{s_0^2}{m}}\,; \tag{6.16 а}$$

$$s_x = \sqrt{\frac{s_a^2}{b^2}\left[\frac{1}{n_j} + \frac{1}{m}\right]}. \qquad (6.17\ а)$$

С учетом значений s_y и s_x могут быть найдены значения величин ΔY и ΔX:

$$\Delta Y = s_y \cdot t\,(P, f); \qquad (6.18)$$

$$\Delta X = s_x \cdot t\,(P, f). \qquad (6.19)$$

Значения s_x и ΔX, найденные при $n_j = 1$, являются характеристиками воспроизводимости аналитического метода, если x – концентрация (количество), а y есть функция x.

Обычно результаты статистической обработки по методу наименьших квадратов сводят в таблицу (табл. 7).

Таблица 7– Результаты статистической обработки экспериментальных данных, полученных при изучении линейной зависимости y = bx + a

f	$\bar{x}$	$\bar{y}$	b	a	$t(P; f)$ при P = 95 %	Δb	Δa	s_0^2	r	s_x при $n_j = 1$, $y_j = \bar{y}$	ΔX	$\frac{\Delta X \cdot 100}{\bar{x}}$, %
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13

Примечание 6.1. Если целью экспериментальной работы являлось определение констант b и a, графы 11, 12 и 13 табл. 7 не заполняются.

Примечание 6.2. Если $y = b \cdot \lg x + a$, вычисления, описанные в разделе 6, выполняют с учетом примечаний 1.2 и 2.2.

Примечание 6.3. Сравнение дисперсий s_0^2, полученных в разных условиях для двух линейных зависимостей, может быть проведено, как указано в разделе 3 (см. выражения (3.4), (3.5) и (3.5 а)).

7. Расчет неопределенности функции нескольких случайных переменных

Описанные в разделах 1 – 6 настоящей общей фармакопейной статьи расчеты доверительных интервалов результатов методик анализа применимы лишь в том случае, если измеряемая величина (концентрация, содержание и т.д.) является функцией только одной случайной переменной. Такая ситуация обычно возникает при использовании прямых методов анализа (титрование, определение сульфатной золы, тяжелых металлов и т.д.). Однако большинство

методик количественного определения в фармакопейном анализе являются косвенными, то есть используют стандартные образцы. Следовательно, измеряемая величина является функцией, как минимум, двух случайных переменных – аналитических сигналов (оптическая плотность, высота или площадь пика и т.д.) испытуемого и стандартного образцов. Кроме того, нередко возникает проблема прогнозирования неопределенности аналитической методики, состоящей из нескольких стадий (взвешивание, разбавление, конечная аналитическая операция), каждая из которых является по отношению к другой случайной величиной.

Таким образом, возникает общая проблема оценки неопределенности косвенно измеряемой величины, зависящей от нескольких измеряемых величин, в частности, как рассчитывать неопределенность всей аналитической методики, если известны неопределенности отдельных ее составляющих (стадий)?

Если измеряемая на опыте величина y является функцией n независимых случайных величин x_i, то есть:

$$y = f(x_1, x_2, ...x_n) \ , \quad (7.1)$$

и число степеней свободы величин x_i одинаково или достаточно велико (> 30, чтобы можно было применять статистику Гаусса, а не Стьюдента), то дисперсия величины y связана с дисперсиями величин x_i соотношением (правило распространения неопределенностей):

$$s_y^2 = \sum_{i=1}^{n} \left(\frac{\partial f}{\partial x_i} \right)^2 \cdot s_{xi}^2 \ . \quad (7.2)$$

Однако на практике степени свободы величин x_t обычно невелики и не равны друг другу. Кроме того, обычно интерес представляют не сами дисперсии (стандартные отклонения), а доверительные интервалы, рассчитать которые, используя уравнение (7.2), при небольших и неодинаковых степенях свободы невозможно. Поэтому для расчета неопределенности величины y (Δ_y) предложены различные подходы, среди которых можно выделить два основных: линейная модель и подход Уэлча–Сатертуэйта.

7.1. Линейная модель

Если случайные переменные x_i статистически независимы, то доверительный интервал функции Δ_y связан с доверительными интервалами переменных Δ_{xi} соотношением (доверительные интервалы берутся для одной и той же вероятности):

$$\Delta_y^2 = \sum_{i=1}^{n} \left(\frac{\partial f}{\partial x_i} \right)^2 \cdot \Delta_{xi}^2 \quad . \qquad (7.3)$$

Данное выражение является обобщением соотношения (7.2).

В фармакопейном анализе измеряемая величина y представляет собой обычно произведение или частное случайных и постоянных величин (масс навесок, разбавлений, оптических плотностей или площадей пиков и т.д.), т.е. *(К* - некая константа):

$$y = \frac{K \cdot x_1 \cdot x_2 \cdot \ldots x_m}{x_{m+1} \cdot x_{m+2} \cdot \ldots x_n} \quad . \qquad (7.4)$$

В этом случае соотношение (7.2) принимает вид:

$$\Delta_{y,r}^2 = \sum_{i=1}^{n} \Delta_{xi,r}^2 \quad , \qquad (7.5)$$

где использованы относительные доверительные интервалы.

Соотношение (7.4) применимо при любых (разных) степенях свободы (в том числе и бесконечных) для величин x_i. Его преимуществом является простота и наглядность. Использование абсолютных доверительных интервалов приводит к гораздо более громоздким выражениям, поэтому рекомендуется использовать относительные величины.

При проведении фармакопейного анализа в суммарной неопределенности *($\Delta_{AS:r}$)* анализа обычно всегда можно выделить такие типы неопределенностей: неопределенность пробоподготовки *(Δ_{SPr}),* неопределенность конечной аналитической операции *($\Delta_{FAO,r}$)* и неопределенность аттестации стандартного образца ($\Delta_{RS,r}$). Величина $\Delta_{RS,r}$ обычно столь мала, что ею можно пренебречь. Учитывая это, а также то, что анализ проводится и для испытуемого раствора (индекс "smp"), и для раствора сравнения (индекс *"st"),* выражение (7.5) можно

представить в виде:

$$\Delta_{As,r} = \sqrt{[(\Delta^{smp}_{sp,r})^2 + (\Delta^{st}_{sp,r})^2] + [(\Delta^{smp}_{FAO,r})^2 + (\Delta^{st}_{FAO,r})^2]} \quad . \quad (7.6)$$

При этом каждое из слагаемых рассчитывается из входящих в него компонентов по формуле (7.5).

Если число степеней свободы величин x_i одинаково или достаточно велико (> 30), выражение (7.5) дает:

$$s^2_{y,r} = \sum_{i=1}^{n} s^2_{xi,r} \quad . \quad (7.7)$$

Это же соотношение получается при тех же условиях и из выражения (7.2).

7.2. Подход Уэлча–Сатертуэйта

В этом подходе дисперсию величины y (s^2_y) рассчитывают по соотношению (7.2), не обращая внимания на различие в степенях свободы (v_i) величин x_i . Для полученной дисперсии s^2_y рассчитывают некое «эффективное» число степеней свободы v_{eff} (которое обычно является дробным), на основе которого затем по таблицам для заданной вероятности находят интерполяцией значения критерия Стьюдента. На основе его далее рассчитывают обычным путем доверительный интервал величины y (Δ_y):

$$v_{eff} = \frac{s^4_y}{\sum_{i=1}^{n} \frac{\left(\frac{\partial f}{\partial x_i}\right)^4 \cdot s^4_{xi}}{v_i}} . \quad (7.8)$$

В фармакопейном анализе для определяемой величины y обычно выполняется уравнение (7.4). В этом случае в подходе Уэлча–Сатертуэйта соотношение (7.2) переходит в выражение (7.7), и соотношение (7.8) принимает более простой вид:

$$\nu_{eff} = \frac{s_{y,r}^4}{\sum_{i=1}^{n} \frac{s_{xi,r}^4}{\nu_i}} \qquad (7.9)$$

Здесь величина $s_{y,r}^4$ рассчитывается из соотношения (7.7).

Подход Уэлча–Сатертуэйта обычно дает более узкие доверительные интервалы, чем линейная модель. Однако он гораздо сложнее в применении и не позволяет выделить так просто неопределенности разных этапов (с последующими рекомендациями по их минимизации), как линейная модель в форме выражения (7.6).

При прогнозе неопределенности анализа используются генеральные величины (с бесконечным числом степеней свободы). В этом случае подход Уэлча–Сатертуэйта совпадает с линейной моделью.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Таблица I

Критические значения контрольного критерия *Q (P, n)*

n	*Q*		
	P = 90 %	*P* = 95 %	*P* = 99 %
3	0,89	0,94	0,99
4	0,68	0,77	0,89
5	0,56	0,64	0,76
6	0,48	0,56	0,70
7	0,43	0,51	0,64
8	040	0,48	0,58
9	0,38	0,46	0,55

Таблица II

Критические значения критерия Стьюдента

f	Доверительная вероятность			*f*	Доверительная вероятность		
	P = 95 %	*P* = 99 %	*P* = 99,9		*P* = 95	*P* = 99 %	*P* = 99,9
1	12,71	63,60		21	2,08	2,83	3,82
2	4,30	9,93	31,60	22	2,07	2,82	3,79
3	3,18	5,84	12,94	23	2,07	2,81	3,77
4	2,78	4,60	8,61	24	2,06	2,80	3,75
5	2,57	4,03	6,86	25	2,06	2,79	3,73
6	2,45	3,71	5,96	26	2,06	2,78	3,71
7	2,37	3,50	5,41	27	2,05	2,77	3,69
8	2,31	3,36	5,04	28	2,05	2,76	3,67
9	2,26	3,25	4,78	29	2,04	2,76	3,66
10	2,23	3,17	4,59	30	2,04	2,75	3,65
11	2,20	3,11	4,44	40	2,02	2,70	3,55
12	2,18	3,06	4,32	50	2,01	2,68	3,50
13	2,16	3,01	4,22	60	2,00	2,66	3,46
14	2,15	2,98	4,14	80	1,99	2,64	3,42
15	2,13	2,95	4,07	10	1,98	2,63	3,39
16	2,12	2,92	4,02	12	1,98	2,62	3,37
17	2,11	2,90	3,97	20	1,97	2,60	3,34
18	2,10	2,88	3,92	50	1,96	2,59	3,31
19	2,09	2,86	3,88	∞	1,96	2,58	3,29
20	2,09	2,85	3,85				
f	*p* = 0,05	*p* = 0,01	*p* = 0,001	*f*	*p* = 0,05	*p* = 0,01	*p* = 0,001
	Уровень значимости				Уровень значимости		

$t = 1{,}958788 + 2{,}429953/f + 2{,}189891/f^2 + 4{,}630189/f^3 + 1{,}398179/f$ при $P = 95$ %;

$t = 2{,}5638 + 5{,}49059/f + 2{,}72654/f^2 + 31{,}2446/f^3 + 21{,}6745/f^{10}$ при $P = 99$ %.

Таблица III

Критические значения критерия Фишера

f_2 – число степеней свобод	f_1 – число степеней свободы для большей дисперсии									
	1	2	3	4	5	6	7	8	20	∞
3	**10,13** 34,12	**9,55** 30,81	**9,28** 29,46	**9,12** 28,71	**9,01** 28,24	**8,94** 27,91	**8,88** 27,67	**8,84** 27,49	**8,66** 26,69	**8,53** 26,12
6	**5,99** 13,74	**5,14** 10,92	**4,76** 9,78	**4,53** 9,15	**4,39** 8,75	**4,28** 8,47	**4,21** 8,26	**4,15** 8,10	**3,87** 7,39	**3,67** 6,88
9	**5,12** 10,56	**4,26** 8,02	**3,86** 6,99	**3,63** 6,42	**3,48** 6,06	**3,87** 5,80	**3,29** 5,62	**3,23** 5,47	**2,93** 4,80	**2,71** 4,31
12	**4,75** 9,33	**3,89** 6,93	**3,49** 5,95	**3,26** 5,41	**3,11** 5,06	**3,00** 4,82	**2,91** 4,64	**2,85** 4,50	**2,54** 3,86	**2,30** 3,36
15	**4,54** 8,68	**3,68** 6,36	**3,29** 5,42	**3,06** 4,89	**2,90** 4,56	**2,79** 4,32	**2,71** 4,14	**2,64** 4,00	**2,33** 3,37	**2,07** 2,87
20	**4,35** 8,10	**3,49** 5,85	**3,10** 4,94	**2,87** 4,43	**2,71** 4,10	**2,60** 3,87	**2,51** 3,70	**2,45** 3,56	**2,12** 2,94	**1,84** 2,42
30	**4,17** 7,56	**3,32** 5,39	**2,92** 4,51	**2,69** 4,02	**2,53** 3,70	**2,42** 3,47	**2,33** 3,30	**2,27** 3,17	**1,93** 2,55	**1,62** 2,01
60	**4,00** 7,08	**3,15** 4,98	**2,76** 4,13	**2,53** 3,65	**2,37** 3,34	**2,25** 3,12	**2,17** 2,95	**2,10** 2,82	**1,75** 2,20	**1,39** 1,60
∞	**3,84** 6,63	**3,00** 4,61	**2,60** 3,78	**2,37** 3,32	**2,21** 3,02	**2,10** 2,80	**2,01** 2,64	**1,94** 2,51	**1,57** 1,88	**1,00** 1,00

F для *P* = 95 % напечатаны жирным шрифтом, а *F* для *P* = 99 % – обычным.

Статистическая обработка результатов определения специфической фармакологической активности лекарственных средств биологическими методами вып.1	**ОФС.1.1.0014.15** **Взамен ГФ X** **Взамен ст. ГФ XI,**

В данной общей фармакопейной статье изложены основные методы планирования и статистической обработки результатов определения специфической фармакологической активности лекарственных средств биологическими методами.

В данной статье используются следующие основные условные обозначения:

a – свободный член линейной регрессии;

b – угловой коэффициент линейной регрессии [тангенс угла наклона линии зависимости величины ответа тест-объекта от логарифма дозы (дозозависимости)[1]] ;

d, *Δ* – разность некоторых величин;

e – основание натурального логарифма;

f – число степеней свободы;

k – число препаратов в испытании (включая стандартный образец), умноженное на количество доз в испытании;

n – число ответов в группе;

p – уровень значимости;

s^2 – дисперсия;

s – среднее квадратическое отклонение;

[1)] В разделе 4.5 *a*, *b*, *c* и *d* – число положительных и отрицательных ответов на 2 сравниваемых испытуемых препарата, применяемых для вычисления значения критерия Пирсона.

s_1, s_2 и s_3 – малая, средняя и большая доза стандартного образца $\underline{S}$;

t – критерий Стьюдента (приложение, табл. II);

u_1, u_2 и u_3 – малая, средняя и большая доза испытуемого препарата $\underline{U}$;

x, y – ответ тест-объекта[2];

$\bar{y}_S$ и $\bar{y}_U$ – средний ответ на стандартный образец и испытуемый препарат;

χ^2 – значение критерия Пирсона;

A_U – ожидаемая активность испытуемого препарата;

B – сумма ответов за 2 дня для каждого животного (двойной перекрест);

C – статистика, применяемая для вычисления доверительного интервала, а также сумма столбцов в методе случайных блоков и латинском квадрате;

D_I и D_{II} – сумма ответов в первый и второй день двойного перекреста;

E – сумма квадратов показателя «Регрессия»;

F – значение критерия Фишера (отношение бóльшей дисперсии к меньшей, см. приложение, табл. III);

I – десятичный логарифм соотношения доз;

K – поправочный коэффициент для дисперсионного анализа;

L – разность логарифмов верхней и нижней доверительной границы биологической активности;

L_S и L_U – линейные контрасты стандартного образца и испытуемого препарата;

M_U – десятичный логарифм биологической активности испытуемого препарата;

M'_U – величина, на которую найденная биологическая активность испытуемого препарата отличается от его ожидаемой биологической активности (в логарифмическом виде);

N – общее число ответов в опыте;

P – доверительная вероятность[3];

[2] В разделе 2 символом «*x*» обозначен логарифм дозы.
[3] В разделе 4.2.1 «*P*» – значение пробита, а в разделе 4.5 «*P*» – статистика, вычисляемая по формуле Фишера.

Q_1, Q_n – контрольные критерии выявления грубых ошибок;

Q_S и Q_U – квадратический контраст для стандартного образца и испытуемого препарата в дисперсионном анализе;

R – сумма блоков в методе случайных блоков или сумма строк в методе латинского квадрата;

R_U – биологическая активность испытуемого препарата (10^{M_U});

$\underline{S}$ – стандартный образец;

S – суммарный ответ на стандартный образец;

S_1, S_2 и S_3 – суммарные ответы на малую, среднюю и большую дозу стандартного образца $\underline{S}$;

$\underline{U}$ – испытуемый препарат;

U – суммарный ответ на испытуемый препарат;

U_1, U_2 и U_3 – суммарные ответы на малую, среднюю и большую дозу испытуемого препарата $\underline{U}$;

W – весовой коэффициент для пробит-метода (приложение, табл. VI), а также весовой коэффициент для объединения независимых биологических испытаний (раздел 5).

1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТА БИОЛОГИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ

Во многих случаях физических и химических анализов достаточно для полной характеристики свойств лекарственных средств. Однако физические и химические показатели не всегда в полной мере отражают терапевтическое действие лекарственного средства. В подобных случаях необходимо определение его биологической активности при помощи непосредственного биологического исследования.

Часто показатель, характеризующий биологическую активность лекарственного средства, учитывают в количественной форме: например концентрация глюкозы в крови при определении биологической активности инсулина, время свертывания крови при действии гепарина и т. д. В этом случае конечным результатом испытания следует считать среднее значение y (ответа тест-объекта), а точнее – его доверительный интервал.

Пример 1. При внутрибрюшинном введении 7 мышам раствора гексенала в дозе 100 мг/кг получены следующие величины продолжительности наркоза y_i (в минутах): 35; 83; 53; 60; 71; 62; 39.

Расчет проводят по следующим формулам при P = 95 %:

средний ответ $y_{\text{ср.}} = \frac{\sum_1^n y_i}{n} = 57{,}60$ мин,

где n – число животных в опыте;

дисперсия ответа $s^2 = \frac{\sum_1^n (y_i - \bar{y})^2}{n-1} = 287{,}95$;

среднее квадратичное отклонение $s = 16{,}97$;

число степеней свободы $f = n - 1 = 6$;

критическое значение критерия Стьюдента: $t(0{,}05;6) = 2{,}45$ (см. табл. II приложения);

полуширина доверительного интервала $\Delta\bar{y} = \frac{t(0{,}05;6) \cdot s}{\sqrt{n}} = 15{,}71$;

$\bar{y} \pm \Delta\bar{y} = 57{,}6 \pm 15{,}7$; $y_{\min} = 41{,}9$ мин; $y_{\max} = 73{,}3$ мин.

Одной из важнейших задач биологических испытаний биологически активных веществ является сравнение испытуемого лекарственного средства со стандартным образцом[4)], для чего испытание проводят одновременно на двух или более группах животных или других тест-объектах. При составлении этих групп следует обеспечивать однородность тест-объектов (по полу, возрасту, массе тела, условиям содержания и т. д.) внутри групп, а также распределение тест-объектов по группам при помощи методов рандомизации. Кроме того, следует стремиться к тому, чтобы число тест-объектов во всех группах было одинаково. Это является условием применимости ряда процедур статистического анализа и всегда упрощает вычисление.

Если по какой-либо причине (ошибка в эксперименте, гибель животного, не связанная с испытанием) в некоторых из групп выпал один или несколько результатов, можно уравнять численность групп одним из следующих способов:

а) исключить из больших групп по одному результату, но обязательно с применением рандомизации;

[4)] В дальнейшем для удобства лекарственное средство с неизвестной биологической активностью будет называться «испытуемый препарат».

б) прибавить к каждой из меньших групп один результат, равный среднему из оставшихся в этой группе результатов, но в дальнейших расчетах число степеней свободы, относящихся к данной группе, должно считаться на единицу меньшим.

Выбор способа выравнивания численности в группах зависит, главным образом, от числа групп, в которых образовались пробелы.

Эти процедуры можно применять и при различии в численности групп на 2 – 3 или большее число единиц, но это всегда менее желательно, так как снижает точность и надежность окончательных выводов по результатам испытания. Сравнение стандартного образца и испытуемого препарата (ИП), то есть проверка того, одинаковы ли их биологические активности, производится при помощи критерия Стьюдента:

$$t_{\text{набл.}} = \frac{|\overline{x_1} - \overline{x_2}|}{\sqrt{\frac{s_1^2 f_1 + s_2^2 f_2}{f_1 + f_2}}} \sqrt{\frac{n_1 n_2}{n_1 + n_2}}, \qquad \text{где } f = n_i - 1;$$

$$t_{\text{критич.}} = 1{,}958788 + \frac{2{,}429953}{f} + \frac{2{,}189891}{f^2} + \frac{4{,}630189}{f^3} + \frac{1{,}398179}{f^9},$$

при $f = n_1 + n_2 - 2 = 16$ и $P = 95$ %.

Пример 2. Опыт, описанный в примере 1, был повторен на другой группе из 7 мышей, но за 15 мин до введения гексенала вводили (также внутрибрюшинно) акрихин в дозе 150 мг/кг. Длительность наркоза y_i оказалась (в минутах): 75; 78; 114; 110; 93; 100; 87. Требуется выяснить, влияет ли предварительное введение акрихина на действие гексенала. Расчет по вышеуказанным формулам дает: $y_1 = 93{,}9$ мин; $s_1^2 = 226{,}48$, $s_1 = 15{,}05$, $f_1 = 6$, $f_{\text{общ.}} = 12$, $t_{\text{набл.}} = 4{,}23$, $t_{\text{критич.}}(0{,}05;12) = 2{,}18$. Из этого можно заключить, что вероятность того, что акрихин влияет на действие гексенала, превышает 95 %.

Примечание. Если s_1^2 / s_2^2 превышает критическое значение критерия Фишера (приложение, табл. III), то для вычисления наблюдаемого значения критерия Стьюдента следует применять формулу:

$$t_{\text{набл.}} = \frac{\left|\overline{x}_1 - \overline{x}_2\right|}{\sqrt{s_1^2 / n_1 + s_2^2 / n_2}} \text{ при } f = \left(n_1 + n_2 - 2\right)\left(0{,}5 + \frac{s_1^2 + s_2^2}{s_1^4 + s_2^4}\right).$$

Вычисленное значение $t_{\text{набл.}}$ сравнивают с $t_{\text{критич.}}$, как указано выше (число степеней свободы f округляют до целого числа). Критическое значение критерия Стьюдента можно также найти в приложении (табл. II).

При сравнении биологических активностей вероятность различия 95 % может считаться приемлемой. Но, если, например, решается вопрос об

отсутствии вредных побочных действий, то требования к вероятности значительно возрастают. При подозрении особо опасного побочного действия «степень риска» $(1-P)=p$ (эту величину называют уровнем значимости) следует снижать до значений 10^{-4} или даже меньших; соответствующие критические значения $t\,(p, f)$ можно найти в специальных математико-статистических таблицах или с помощью компьютерных программ. Если выбран определенный уровень значимости p, то при $t > t\,(p)$ или $t > t\,(P)$ различие считается значимым. В этом случае вычисляют доверительный интервал разности сравниваемых показателей.

Чувствительность указанного метода сравнения двух ИП значительно возрастает, если можно организовать испытание их на ряде достаточно однородных (сопряженных) пар тест-объектов. Сопряженную пару могут составить, например, животные из одного помета, одинакового пола и близкой массы тела или, если это допускается методикой испытания, 2 повторных определения на одном животном с достаточным разрывом во времени, обеспечивающим восстановление исходного состояния после первого опыта.

При использовании n сопряженных пар y_1, y_1', y_2, y_2', … y_n, y_n' составляют ряд разностей $d_1=y_1-y_1'$, $d_2=y_2-y_2'$, … $d_n=y_n-y_n'$ и вычисляют величину:

$$t=\frac{|\bar{d}|}{s_{\bar{d}}}\sqrt{n},$$

где $\bar{d}=\sum d/n$,

$$s_{\bar{d}}=\sqrt{\frac{\sum\left(d_i-\bar{d}\right)^2}{n-1}}$$

Полученную величину t сравнивают с табличным значением $t\,(p, f)$ для принятого уровня значимости p и числа степеней свободы $f = n - 1$.

Пример 3. Пусть тест-объекты № 1, 2, ... 7 из примера 1 были сопряжены с тест-объектами № 3, 1, 5, 2, 6, 4, 7 из примера 2 (в каждой паре были мыши из одного помета примерно с одинаковой массой тела). Тогда получается: d = 254/7 =36,3, s_d = 27,27, t =3,52, в

то время как t (P = 95 %, f = 6) = 2,45 и t (P = 99 %, f = 6) = 3,71; t (P = 99,9 %, f = 6) = 5,96.

2. ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ РАСЧЕТОВ

В подавляющем большинстве случаев в интервале обычно применяемых доз фармакологический эффект (когда он выражается количественно), связан линейно с логарифмом дозы. Эту связь отражает уравнение линейной регрессии:

$$y = a + b\,x,$$

где a – свободный член линейной регрессии;

b – угловой коэффициент линейной регрессии;

x – логарифм дозы.

Определение биологической активности проводят путем сравнения линий дозозависимости стандартного образца и испытуемого препарата.

В процессе статистической обработки результатов биологического испытания для того, чтобы проверить правильность проведенного опыта и вычислить его дисперсию, проводят дисперсионный анализ, с помощью которого определяют следующие компоненты или источники дисперсии (показатели):

- линейность (при использовании не менее трех доз стандартного образца и испытуемого препарата)[5];
- параллельность;
- дозозависимость;
- блоки или строки (при необходимости);
- столбцы (при необходимости);
- дни × параллельность (при необходимости);
- другие вспомогательные показатели.

[5] Для «лианеризации» дозозависимости ответы тест-объектов (y) можно подвергать различным преобразованиям (логарифмировать, извлекать квадратный корень, возводить в квадрат и др.).

Затем вычисляют биологическую активность испытуемого препарата относительно стандартного образца (ее среднее значение и доверительные границы).

Объединение результатов двух и более биологических испытаний одного и того же препарата проводят согласно разделу 5 «Объединение результатов независимых определений биологической активности».

Ниже, в качестве примеров, приведены рекомендуемые алгоритмы вычисления биологической активности испытуемых препаратов в зависимости от типа ответа тест-объектов и наиболее распространенных видов постановок. Для расчетов можно использовать электронные таблицы.[6)] Возможно применение специального валидированного статистического (в т. ч. биометрического) программного обеспечения, в котором могут быть реализованы общие методы анализа, а также другие методы определения специфической фармакологической активности, например, четырехпараметрический метод анализа *S*-образных кривых для иммунологических лекарственных средств (3.9).

3. БИОЛОГИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ, ОСНОВАННЫЕ НА КОЛИЧЕСТВЕННОМ ОТВЕТЕ

3.1. *Обработка результатов двухдозовой рандомизированной постановки (на примере биологической активности гонадотропина хорионического)*

Если в качестве тест-объекта используют крыс-самок, то в качестве ответа животного принимают отношение массы матки в мг к массе тела в г. В случае использования самцов, ответ животного представляет собой отношение массы добавочных половых желез в мг к массе тела в г. Схема расчетов при этом абсолютно одинакова. В табл. 1 даны ответы крыс-самок на введение двух доз стандартного образца и двух доз испытуемого препарата.

Таблица 1 – Ответы *y*

[6)] При этом за счет разницы в точности вычислений полученные результаты могут незначительно отличаться от приведенных в статье.

Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 4
s_1	s_2	u_1	u_2
0,398	2,233	0,533	3,447
0,443	2,129	0,663	3,123
0,483	2,872	0,434	3,354
0,623	2,732	0,710	1,769
0,462	3,043	0,637	4,382
0,619	2,717	0,470	3,525
0,436	2,939	0,650	3,331
0,495	1,785	0,600	3,995
0,568	3,474	0,820	2,977
0,593	3,120	0,512	2,556

Таблица 2 – Суммы ответов и контрасты

	Стандартный образец $\underline{S}$	Испытуемый препарат $\underline{U}$	Сумма
Малая доза	$S_1 = 5{,}12$	$U_1 = 6{,}03$	
Большая доза	$S_2 = 27{,}04$	$U_2 = 32{,}46$	
Сумма	$S = 32{,}16$	$U = 38{,}49$	$\sum y = 70{,}65$
Линейный контраст	$L_S = S_2 - S_1 = 21{,}92$	$L_U = U_2 - U_1 = 26{,}43$	$\sum L = 48{,}35$

Для того чтобы проверить правильность проведенного опыта и вычислить его дисперсию, проводят дисперсионный анализ полученных данных. При этом рассчитывают значения дисперсий для 6 источников дисперсии (см. табл. 3).

Для этого на основании данных, представленных в табл. 1 и 2, а также поправочного коэффициента, вычисляют суммы квадратов источников дисперсии.

Поправочный коэффициент $K = \frac{\left(\sum y\right)^2}{N} = \frac{70{,}65^2}{40} = 124{,}8$;

$$\textit{Препараты} = \frac{S^2 + U^2}{2n} - K = \frac{32{,}16^2 + 38{,}49^2}{20} - 124{,}8 = 0{,}99;$$

$$\textit{Регрессия} = \frac{\left(L_S + L_U\right)^2}{4n} = \frac{48{,}35^2}{40} = 58{,}44 = E;$$

$$\textit{Параллельность} = \frac{L_S^2 + L_U^2}{2n} - E = \frac{21{,}92^2 + 26{,}43^2}{20} - 58{,}44 = 0{,}51;$$

$$\textit{Обработки} = \frac{S_1^2 + S_2^2 + U_1^2 + U_2^2}{n} - K =$$

$$= \frac{5{,}12^2 + 27{,}04^2 + 6{,}03^2 + 32{,}46^2}{10} - 124{,}8 = 59{,}94;$$

$$Итог = \sum\left(y^2\right) - K = 192{,}03 - 124{,}8 = 67{,}23;$$

$$Отклонение = итог - обработки = 67{,}23 - 59{,}94 = 7{,}29.$$

Таблица 3– Сводная таблица дисперсионного анализа (двухдозовая рандомизированная постановка)

Источник дисперсии (показатель)	Число степеней свободы (*f*)	Сумма квадратов	Средний квадрат, $\left(\frac{сумма\ квадратов}{f}\right)$	Наблюдаемое значение критерия Фишера $F_{набл.}$	Критическое значение критерия Фишера $F_{критич.}$
Препараты	1	0,99	0,99		
Регрессия	1	58,44	58,44	292,2	>7,40 (*P*=99 %)
Параллельность	1	0,51	0,51	2,55	<4,11 (*P*=95 %)
Обработки	$k-1=4-1=3=f_{об.}$	59,94	19,98		
Отклонение	$N-1-f_{об.}-m=$ $=39-3=36$	7,29	0,20		
Итог	$N-1-m=39$	67,23			

n = 10 (число ответов в группе);

N = 40 (общее число ответов в опыте);

m = 0 (число утраченных и замененных значений).

Значимость различий дисперсий проверяют с помощью критерия Фишера. Обязательным является выполнение требований для показателей *«Регрессия»* и *«Параллельность»*. Эти требования заключаются в том, что для *«Регрессии»* наблюдаемое значение критерия Фишера должно быть больше критического (*P* = 99 %), а для *«Параллельности»* – меньше критического
(*P* = 95 %).

Для того чтобы найти $F_{набл.}$ средние квадраты показателей делят на средний квадрат показателя *«Отклонение»*. Полученные результаты сравнивают с табличными критическими значениями критерия Фишера (приложение, табл. III). Число степеней свободы $f_1 = 1$, а $f_2 = 36$.

Дисперсионный анализ показал правильность результатов опыта: статистическую значимость дозозависимости (*«Регрессия»*) и параллельность 2 линий регрессии (*«Параллельность»*).

Вычисление биологической активности и ее доверительных границ

Соотношение доз равно 2, следовательно $I = \lg 2{,}0 = 0{,}3010$;

$t = 2{,}03$ при $f = 36$ и $P = 95$ %;

$$b = \frac{L_S + L_U}{I \cdot 2n} = \frac{48{,}35}{6{,}02} = 8{,}03;$$

$$\bar{y}_S = \frac{S}{2n} = \frac{32{,}16}{20} = 1{,}61;$$

$$\bar{y}_U = \frac{U}{2n} = 1{,}92;$$

$$M'_U = \frac{\bar{y}_U - \bar{y}_S}{b} = 0{,}039;$$

$A_U = 1000$ ЕД/фл.;

$M_U = M'_U + \lg A_U = 3{,}039;$

Биологическая активность $R_U = 10^{3{,}039} = 1093{,}96$ ЕД/фл.;

$C = E/\left(E - s^2 t^2\right) = 58{,}44/\left(58{,}44 - 0{,}20 \cdot 2{,}03^2\right) = 1{,}014.$

Логарифмические доверительные границы биологической активности испытуемого препарата вычисляют по формуле:

$$CM'_U \pm \sqrt{(C-1)\left(CM'^{\,2}_U + I^2\right)} =$$

$$= 1{,}014 \cdot 0{,}039 \pm \sqrt{0{,}014 \cdot \left(1{,}014 \cdot 0{,}039^2 + 0{,}3010^2\right)}.$$

Логарифмические доверительные границы биологической активности испытуемого препарата составляют 0,0036 и 0,0755. Нижняя и верхняя доверительная граница составляет $10^{\lg A_U + 0{,}0036}$ и $10^{\lg A_U + 0{,}0755}$, т. е. 1008,3 и 1189,9 ЕД/фл. соответственно.

3.2. Обработка результатов трехдозовой рандомизированной постановки (на примере биологической активности гонадотропина хорионического)

Если в качестве тест-объекта используют крыс-самок, то в качестве ответа животного принимают отношение массы матки в мг к массе тела в г. В случае использования самцов, ответ животного представляет собой

отношение массы добавочных половых желез в мг к массе тела в г. Схема расчетов при этом абсолютно одинакова. В табл. 4 даны ответы крыс-самок на введение трех доз стандартного образца и трех доз испытуемого препарата.

Таблица 4 – Ответы y

Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 4	Группа 5	Группа 6
s_1	s_2	s_3	u_1	u_2	u_3
0,398	1,583	2,233	0,533	1,655	3,447
0,443	0,780	2,129	0,663	0,935	3,123
0,483	2,380	2,872	0,434	1,973	3,354
0,623	0,984	2,732	0,71	2,199	1,769
0,462	1,265	3,043	0,637	0,886	4,382
0,619	1,568	2,717	0,47	1,097	3,525
0,436	1,167	2,939	0,65	2,447	3,331
0,495	1,743	1,785	0,600	1,941	3,995
0,568	1,375	3,474	0,820	1,151	2,977
0,593	1,375	3,120	0,512	2,804	2,556

Таблица 5 – Суммы ответов и контрасты

	Стандартный образец $\underline{S}$	Испытуемый препарат $\underline{U}$	Сумма
Малая доза	$S_1 = 5{,}12$	$U_1 = 6{,}03$	
Средняя доза	$S_2 = 14{,}22$	$U_2 = 17{,}09$	
Большая доза	$S_3 = 27{,}04$	$U_3 = 32{,}46$	
Сумма	$S = 46{,}38$	$U = 55{,}58$	$\sum y = 101{,}96$
Линейный контраст	$L_S = S_3 - S_1 = 21{,}92$	$L_U = U_3 - U_1 = 26{,}43$	$\sum L = 48{,}35$
Квадратический контраст	$Q_S = S_1 - 2S_2 + S_3 = 3{,}72$	$Q_U = U_1 - 2U_2 + U_3 = 4{,}31$	$\sum Q = 8{,}03$

Для того чтобы проверить правильность проведенного опыта и вычислить его дисперсию, проводят дисперсионный анализ полученных данных. При этом рассчитывают значения дисперсий для 8 источников дисперсии (см. сводную табл. 6).

Для этого на основании данных, представленных в табл. 4 и 5, а также поправочного коэффициента, вычисляют суммы квадратов источников дисперсии.

Поправочный коэффициент $K = \frac{\left(\sum y\right)^2}{N} = \frac{101{,}96^2}{60} = 173{,}26$;

$$Препараты = \frac{S^2 + U^2}{3n} - K = \frac{46{,}38^2 + 55{,}58^2}{30} - 173{,}26 = 1{,}41;$$

$$Регрессия = \frac{(L_S + L_U)^2}{4n} = \frac{48{,}35^2}{40} = 58{,}44 = E;$$

$$Параллельность = \frac{L_S^2 + L_U^2}{2n} - E = \frac{21{,}92^2 + 26{,}43^2}{20} - 58{,}44 = 0{,}51;$$

$$Квадратичность = \frac{(Q_S + Q_U)^2}{12n} = \frac{8{,}03^2}{120} = 0{,}54;$$

$$Разность\ квадратичностей = \frac{Q_S^2 + Q_U^2}{6n} - квадратичность = \frac{32{,}41}{60} - 0{,}54 \approx 0{,}0002;$$

$$Обработки = \frac{S_1^2 + S_2^2 + S_3^2 + U_1^2 + U_2^2 + U_3^2}{n} - K =$$

$$= \frac{5{,}12^2 + 14{,}22^2 + 27{,}04^2 + 6{,}03^2 + 17{,}09^2 + 32{,}46^2}{10} - 173{,}26 = 60{,}9;$$

$$Итог = \sum (y^2) - K = 247{,}3 - 173{,}26 = 74{,}04;$$

$$Отклонение = итог - обработки = 74{,}04 - 60{,}9 = 13{,}14.$$

Таблица 6 – Сводная таблица дисперсионного анализа (трехдозовая рандомизированная постановка)

Источник дисперсии (показатель)	Число степеней свободы (*f*)	Сумма квадратов	Средний квадрат, $(\frac{\text{сумма квадратов}}{f})$	Наблюдаемое значение критерия Фишера $F_{набл.}$	Критическое значение критерия Фишера $F_{критич.}$
Препараты	1	1,41	1,41		
Регрессия	1	58,44	58,44	243,5	>7,13 (*P*=99 %)
Параллельность	1	0,51	0,51	2,13	<4,02 (*P*=95 %)
Квадратичность	1	0,54	0,54	2,25	<4,02 (*P*=95 %)
Разность квадратичностей	1	0,0002	0,0002	0,0008	<4,02 (*P*=95 %)
Обработки	k - 1 = 6-1 = 5 = $f_{общ.}$	60,9	12,18		
Отклонение	$N - 1 - f_{об.} - m$ = = 59 – 5 = 54	13,14	0,24		
Итог	$N - 1 - m$ = 59	74,04			

n = 10 (число ответов в группе);
N = 60 (общее число ответов в опыте);
m = 0 (число утраченных и замененных значений).

Значимость различий дисперсий проверяют с помощью критерия Фишера. Обязательным является выполнение требований для показателей *«Регрессия»*, *«Параллельность»*, *«Квадратичность»* и *«Разность квадратичностей»*. Для *«Регрессии»* наблюдаемое значение критерия Фишера должно быть больше критического (P = 99 %), а для остальных показателей – меньше критического (P = 95 %).

Для того чтобы найти $F_{\text{набл.}}$ средние квадраты показателей делят на средний квадрат показателя *«Отклонение»*. Полученные результаты сравнивают с табличными критическими значениями критерия Фишера (приложение, табл. III). Число степеней свободы $f_1 = 1$, а $f_2 = 54$.

Дисперсионный анализ показал правильность результатов опыта: статистическую значимость дозозависимости (*«Регрессия»*), параллельность и линейность двух линий регрессии (*«Параллельность»*, *«Квадратичность»* и *«Разность квадратичностей»*).

Вычисление биологической активности и ее доверительных границ

Соотношение доз равно 2, следовательно $I = \lg 2{,}0 = 0{,}3010$;

$t = 1{,}958788 + 2{,}429953/f + 2{,}189891/f^2 + 4{,}630189/f^3 + 1{,}398179/f^9 = 2.00$,

при $f = 54$ и $P = 95$ %;

$$b = \frac{L_S + L_U}{I \cdot 4n} = \frac{48{,}35}{12{,}04} = 4{,}02;$$

$$\bar{y}_S = \frac{S}{3n} = \frac{46{,}38}{18} = 1{,}55;$$

$$\bar{y}_U = \frac{U}{3n} = 1{,}85;$$

$$M'_U = \frac{\bar{y}_U - \bar{y}_S}{b} = 0{,}075;$$

Ожидаемая активность $A_U = 1000$ ЕД/фл.;

$M_U = M'_U + \lg A_U = 3{,}075$;

Биологическая активность $R_U = 10^{3{,}075} = 1188{,}50$ ЕД/фл.;

$C = E/\left(E - s^2 t^2\right) = 58{,}44/\left(58{,}44 - 0{,}24 \cdot 2{,}00^2\right) = 1{,}017.$

Логарифмические доверительные границы биологической активности испытуемого препарата вычисляют по формуле:

$$CM_U^{'} \pm \sqrt{(C-1)\left(CM_U^{'\,2} + 8/3 \cdot I^2\right)} =$$

$$= 1{,}017 \cdot 0{,}075 \pm \sqrt{0{,}017 \cdot \left(1{,}017 \cdot 0{,}075^2 + 8/3 \cdot 0{,}3010^2\right)}.$$

Логарифмические доверительные границы биологической активности испытуемого препарата составляют 0,0114 и 0,1411. Нижняя и верхняя доверительная граница составляет $10^{\lg Au+0{,}0114}$ и $10^{\lg Au+0{,}1411}$, т. е. 1026,6 и 1383,9 ЕД/фл. соответственно.

3.3. Обработка результатов двухдозовой постановки методом случайных блоков (на примере биологической активности окситоцина на петушке)

При использовании петушка в качестве тест-объекта ответом является величина падения артериального давления (мм) после введения двух доз стандартного образца окситоцина и двух доз испытуемого препарата. Порядок введения доз приведен в табл. 10.

Таблица 7 – Ответы *y*

s_1	s_2	u_1	u_2	Блоки (*R*)
12	20	14	20	66
15	23	16	22	76
15	20	14	23	72
15	20	14	24	73

Таблица 8– Суммы ответов и контрасты

	Стандартный образец $\underline{S}$	Испытуемый препарат $\underline{U}$	Сумма
Малая доза	$S_1 = 57$	$U_1 = 58$	
Большая доза	$S_2 = 83$	$U_2 = 89$	
Сумма	$S = 140$	$U = 147$	$\sum y = 287$
Линейный контраст	$L_S = 26$	$L_U = 31$	$\sum L = 57$

Для того чтобы проверить правильность проведенного опыта и вычислить его дисперсию, проводят дисперсионный анализ полученных данных. При этом рассчитывают значения дисперсий для 7 источников дисперсии (см. сводную табл. 9).

Для этого на основании данных, представленных в табл. 7 и 8, а также поправочного коэффициента, вычисляют суммы квадратов источников дисперсии.

Поправочный коэффициент $K = \frac{(\sum y)^2}{N} = \frac{287^2}{16} = 514{,}06$;

$$\text{Препараты} = \frac{S^2 - U^2}{2n} - K = \frac{140^2 - 147^2}{8} - 514{,}06 = 3{,}065;$$

$$\text{Регрессия} = \frac{(L_s + L_u)^2}{4n} = \frac{57^2}{16} = 203{,}06 = E;$$

$$\text{Параллельность} = \frac{{L_s}^2 + {L_u}^2}{2n} - E = \frac{26^2 - 31^2}{8} - 203{,}06 = 1{,}565;$$

$$\text{Обработки} = \frac{{S_1}^2 + {S_2}^2 + {U_1}^2 + {U_2}^2}{n} - K = \frac{57^2 + 83^2 + 58^2 + 89^2}{4} - 5148{,}06 = 207{,}69$$

$$\text{Блоки} = \frac{{R_1}^2 + {R_2}^2 + {R_3}^2 + {R_4}^2}{4} - K = \frac{66^2 + 76^2 + 72^2 + 73^2}{4} - 5148{,}06 = 13{,}19$$

$$\text{Итог} = \sum(y^2) - K = 5381 - 5148{,}06 = 232{,}94;$$

Отклонение = Итог – обработки – блоки = 232,94-207,69-13,19=12,06

Таблица 9 – Сводная таблица дисперсионного анализа (метод случайных блоков)

Источник дисперсии (показатель)	Число степеней свободы (*f*)	Сумма квадратов	Средний квадрат, $\left(\frac{\text{сумма квадратов}}{f}\right)$	Наблюдаемое значение критерия Фишера $F_{\text{набл.}}$	Критическое значение критерия Фишера $F_{\text{критич.}}$
Препараты	1	3,065	3,065		
Регрессия	1	203,06	203,06	151,54	>10,56 (*P*=99 %)
Параллельность	1	1,565	1,565	1,17	<5,12 (*P*=95 %)
Обработки	$k - 1 = 4 - 1 = 3 = f_{\text{об.}}$	207,69	69,23		
Блоки	$n - 1 = 3 = f_{\text{б.}}$	13,19	4,40	3,28	<6,99 (*P*=99 %)
Отклонение	$N - 1 - f_{\text{об.}} - f_{\text{б.}} - m = 9$	12,06	1,34		
Итог	$N - 1 - m = 15$	232,94	15,53		

$n = 4$ (число ответов на дозу);
$N = 16$ (общее число ответов в опыте);
$m = 0$ (число утраченных и замененных значений).

Значимость различий дисперсий проверяют с помощью критерия Фишера. Обязательным является выполнение требований для показателей *«Регрессия»*, *«Параллельность»* и *«Блоки»*. Для *«Регрессии»* наблюдаемое значение критерия Фишера должно быть больше критического (*P* = 99 %), а для *«Параллельности»* и *«Блоков»* – меньше критического (*P* = 95 % и *P* = 99 % соответственно). Для того чтобы найти $F_{\text{набл.}}$, средние квадраты

показателей делят на средний квадрат показателя *«Отклонение»*. Полученные результаты сравнивают с табличными критическими значениями критерия Фишера (приложение, табл. III). Число степеней свободы $f_1 = 1$ или 3, а $f_2 = 9$.

Дисперсионный анализ показал правильность результатов опыта: статистическую значимость дозозависимости (*«Регрессия»*), параллельность двух линий регрессии (*«Параллельность»*) и отсутствие статистически значимых различий между блоками (*«Блоки»*).

Вычисление биологической активности и ее доверительных границ

Соотношение доз равно 2, следовательно $I = \lg 2{,}0 = 0{,}3010$;

$$t = 1{,}958788 + 2{,}429953/f + 2{,}189891/f^2 + 4{,}630189/f^3 + 1{,}398179/f^9 = 2{,}262,$$

при $f = 9$ и $P = 95$ %;

$$b = \frac{L_S + L_U}{I \cdot 2n} = \frac{57}{2{,}408} = 23{,}67;$$

$$\bar{y}_S = \frac{S}{2n} = \frac{140}{8} = 17{,}50;$$

$$\bar{y}_U = \frac{U}{2n} = 18{,}38;$$

$$M_U^{'} = \frac{\bar{y}_U - \bar{y}_S}{b} = 0{,}037;$$

Ожидаемая активность $A_U = 5$ ЕД/мл;

$$M_U = M_U^{'} + \lg A_U = 0{,}736;$$

Биологическая активность $R_U = 10^{0{,}736} = 5{,}45$ ЕД/мл;

$$C = E/\left(E - s^2 t^2\right) = 203{,}06/\left(203{,}06 - 1{,}34 \cdot 2{,}262^2\right) = 1{,}035.$$

Логарифмические доверительные границы биологической активности испытуемого препарата вычисляют по формуле:

$$CM_U^{'} \pm \sqrt{(C-1)\left(CM_U^{'\,2} + I^2\right)} = 1{,}035 \cdot 0{,}037 \pm \sqrt{0{,}035 \cdot \left(1{,}035 \cdot 0{,}037^2 + 0{,}3010^2\right)}.$$

Логарифмические доверительные границы биологической активности испытуемого препарата составляют – 0,0185 и 0,0950. Нижняя и верхняя доверительная граница составляет $1\,0^{\lg A_U + (-0{,}0185)}$ и $1\,0^{\lg A_U + 0{,}0950}$, т. е. 4,79 и 6,22 ЕД/мл соответственно.

3.4. Обработка результатов двухдозовой постановки методом латинского квадрата (на примере биологической активности окситоцина на изолированном органе)

При использовании в качестве тест-объекта изолированного рога матки крысы, ответом является величина его изотонического сокращения в ответ на введение двух доз стандартного образца окситоцина и двух доз испытуемого препарата. Эти сокращения регистрируют в виде амплитуды перемещения писчика механического рычага или пера электронного самописца (см или мм). Порядок введения доз приведен в табл. 10.

Таблица 10 – Схема двухдозового латинского квадрата

1.	s_1	s_2	u_1	u_2
2.	u_2	s_1	s_2	u_1
3.	u_1	u_2	s_1	s_2
4.	s_2	u_1	u_2	s_1

Таблица 11 – Ответы y (см)

Строка	Столбцы				Сумма строк, R	R^2
1.	6,50	12,45	9,75	12,5	$R_1 = 41{,}20$	1697,44
2.	12,20	5,35	12,70	6,10	$R_2 = 36{,}35$	1321,32
3.	6,40	12,30	5,25	12,85	$R_3 = 36{,}80$	1354,24
4.	12,80	5,70	11,55	4,30	$R_4 = 34{,}35$	1179,92
Сумма столбцов (C)	37,90	35,80	39,25	35,75		$\sum R^2 = 5552{,}925$
C^2	1436,41	1281,64	1540,56	1278,063	$\sum C^2 = 5536{,}675$	

Таблица 12 – Суммы ответов и контрасты

	Стандартный образец $\underline{S}$	Испытуемый препарат $\underline{U}$	Сумма
Малая доза	$S_1 = 21{,}40$	$U_1 = 27{,}95$	
Большая доза	$S_2 = 50{,}80$	$U_2 = 48{,}55$	
Сумма	$S = 72{,}20$	$U = 76{,}5$	$\sum y = 148{,}70$
Линейный контраст	$L_S = 29{,}40$	$L_U = 20{,}6$	$\sum L = 50{,}00$

Для того чтобы проверить правильность проведенного опыта и вычислить его дисперсию, проводят дисперсионный анализ полученных данных. При этом рассчитывают значения дисперсий для 8 источников дисперсии (см. сводную табл. 13).

Для этого на основании данных, представленных в табл. 11 и 12, а также поправочного коэффициента вычисляют суммы квадратов источников дисперсии.

Поправочный коэффициент $K = \frac{\left(\sum y\right)^2}{N} = \frac{148{,}7^2}{16} = 1381{,}98$;

$$\textit{Препараты} = \frac{S^2 + U^2}{2n} - K = \frac{72{,}2^2 + 76{,}5^2}{8} - 1381{,}98 = 1{,}156;$$

$$\textit{Регрессия} = \frac{\left(L_S + L_U\right)^2}{4n} = \frac{50{,}00^2}{16} = 156{,}25 = E;$$

$$\textit{Параллельность} = \frac{L_S^2 + L_U^2}{2n} - E = \frac{29{,}40^2 + 20{,}6^2}{8} - 156{,}25 = 4{,}84;$$

$$\textit{Обработки} = \frac{S_1^2 + S_2^2 + U_1^2 + U_2^2}{n} - K =$$

$$= \frac{21{,}4^2 + 50{,}8^2 + 27{,}95^2 + 48{,}55^2}{4} - 1381{,}98 = 162{,}246;$$

$$\textit{Строки} = \frac{R_1^2 + R_2^2 + R_3^2 + R_4^2}{4} - K = \frac{5552{,}925}{4} - 1381{,}98 = 6{,}25;$$

$$\textit{Столбцы} = \frac{C_1^2 + C_2^2 + C_3^2 + C_4^2}{4} - K = \frac{5536{,}675}{4} - 1381{,}98 = 2{,}19;$$

$$\textit{Итог} = \sum\left(y^2\right) - K = 1557{,}685 - 1381{,}98 = 175{,}705;$$

$$\textit{Отклонение} = \textit{итог} - \textit{обработки} - \textit{строки} - \textit{столбцы} =$$

$$= 175{,}705 - 162{,}246 - 6{,}25 - 2{,}19 = 5{,}02.$$

Таблица 13 – Сводная таблица дисперсионного анализа (латинский квадрат)

Источник дисперсии (показатель)	Число степеней свободы (*f*)	Сумма квадратов	Средний квадрат $\left(\frac{\textit{сумма квадратов}}{f}\right)$	Наблюдаемое значение критерия Фишера $F_{\text{набл.}}$	Критическое значение критерия Фишера $F_{\text{критич.}}$
Препараты	1	1,156	1,156		
Регрессия	1	156,25	156,25	186,75	>13,75 (*P*=99 %)
Параллельность	1	4,84	4,84	5,78	<5,99 (*P*=95 %)
Обработки	$k-1=4-1=3=f_{\text{об}}$	162,246	54,082		
Строки	$n-1=3=f_{\text{стр.}}$	6,25	2,083	2,49	<9,78 (*P*=99 %)
Столбцы	$n-1=3=f_{\text{ст.}}$	2,19	0,73	0,872	<9,78 (*P*=99 %)
Отклонение	$N-1-f_{\text{об.}}-f_{\text{стр.}}-$ $-f_{\text{ст.}}-m=6$	5,02	0,837		

Источник дисперсии (показатель)	Число степеней свободы (*f*)	Сумма квадратов	Средний квадрат $\left(\frac{\textit{сумма квадратов}}{f}\right)$	Наблюдаемое значение критерия Фишера $F_{\text{набл.}}$	Критическое значение критерия Фишера $F_{\text{критич.}}$
Итог	$N-1-f_{\text{об.}}-f_{\text{стр.}}-$ $-f_{\text{ст.}}-m=6$	175,705	11,71		

$n = 4$ (число ответов на дозу);
$N = 16$ (общее число ответов в опыте);
$m = 0$ (число утраченных и замененных значений).

Значимость различий дисперсий проверяют с помощью критерия Фишера. Обязательным является выполнение требований для показателей *«Регрессия»*, *«Параллельность»*, *«Строки»* и *«Столбцы»*. Для *«Регрессии»* наблюдаемое значение критерия Фишера должно быть больше критического (P = 99 %), а для показателей *«Параллельность»* (P = 95 %), *«Строки»* (P = 99 %) *«Столбцы»* (P = 99 %) – меньше критического. Показатель *«Регрессия»* характеризует дозозависимость, *«Параллельность»* – параллельность двух линий регрессии, а *«Строки»* и *«Столбцы»* – сбалансированность ответов изолированного органа на протяжении всего опыта.

Для того чтобы найти $F_{\text{набл.}}$ средние квадраты показателей делят на средний квадрат показателя *«Отклонение»*. Полученные результаты сравнивают с табличными критическими значениями критерия Фишера (приложения, табл. III). Число степеней свободы $f_1 = 1$ или 3, а $f_2 = 6$.

Дисперсионный анализ показал правильность результатов опыта: статистическую значимость дозозависимости (*«Регрессия»*), параллельность двух линий регрессии (*«Параллельность»*) и отсутствие статистически значимых различий между строками и столбцами (см. «Одноименные показатели»).

Вычисление биологической активности и ее доверительных границ

Соотношение доз равно 2, следовательно $I = \lg 2{,}0 = 0{,}3010$;

$t = 1{,}958788 + 2{,}429953 / f + 2{,}189891 / f^2 + 4{,}630189 / f^3 + 1{,}398179 / f^9 = 2{,}446$

,

при $f = 6$ и $P = 95$ %;

$$b = \frac{L_S + L_U}{I \cdot 2n} = \frac{50{,}00}{0{,}3010 \cdot 8} = 20{,}764;$$

$$\bar{y}_S = \frac{S}{2n} = \frac{72{,}20}{8} = 9{,}0250;$$

$$\bar{y}_U = \frac{U}{2n} = 9{,}5625;$$

$$M_U' = \frac{\bar{y}_U - \bar{y}_S}{b} = 0{,}0259;$$

Ожидаемая активность $A_U = 5$ ЕД/мл;

$M_U = M_U' + \lg A_U = 0{,}725;$

Биологическая активность $R_U = 10^{0{,}725} = 5{,}31$ ЕД/мл;

$C = E/\left(E - s^2 t^2\right) = 156{,}25/\left(156{,}25 - 0{,}837 \cdot \times 2{,}446^2\right) = 1{,}033.$

Логарифмические доверительные границы биологической активности испытуемого препарата вычисляют по формуле:

$$CM_U' \pm \sqrt{(C-1)(CM_U'^2 + I^2)} = 1{,}033 \cdot 0{,}0259 \pm \sqrt{0{,}033 \cdot (1{,}033 \cdot 0{,}0259^2 + 0{,}3010^2)}.$$

Логарифмические доверительные границы биологической активности испытуемого препарата составляют – 0,0281 и 0,0816. Нижняя и верхняя доверительная граница составляет $10^{\lg A_U + (-0{,}028)}$ и $10^{\lg A_U + 0{,}0816}$, т. е. 4,69 и 6,03 ЕД/мл соответственно.

3.5. Обработка результатов трехдозовой постановки методом латинского квадрата (на примере биологической активности антибиотиков методом диффузии в агар в чашках Петри)

Биологическую активность антибиотиков определяют по зонам угнетения роста микроорганизмов. В каждую чашку Петри вносят по 3 раствора стандартного образца и 3 раствора испытуемого препарата. В качестве ответа принимают диаметр зоны угнетения в мм. Последовательность внесения растворов в лунки или цилиндры приведена в табл. 14.

Таблица 14 – Схема трехдозового латинского квадрата

№ чашки	Доза					
1	s_1	s_2	s_3	u_1	u_2	u_3

2	u_3	s_1	s_2	s_3	u_1	u_2
3	u_2	u_3	s_1	s_2	s_3	u_1
4	u_1	u_2	u_3	s_1	s_2	s_3
5	s_3	u_1	u_2	u_3	s_1	s_2
6	s_2	s_3	u_1	u_2	u_3	s_1

Таблица 15 – Ответы y

Строка	Столбцы						Сумма строк (R)	R^2
1	16,4	17,6	18,2	16,2	17,2	18,4	$R_1 = 104{,}0$	10816,00
2	17,8	16,4	17,4	18,2	16,0	17,2	$R_2 = 103{,}0$	10609,00
3	17,0	18,4	16,6	17,2	18,8	15,4	$R_3 = 103{,}4$	10691,56
4	16,4	16,6	18,0	16,0	17,6	18,0	$R_4 = 102{,}6$	10526,76
5	18,2	16,0	17,4	18,6	16,2	17,4	$R_5 = 103{,}8$	10774,44
6	17,4	18,4	16,2	17,4	18,0	16,0	$R_6 = 103{,}4$	10691,56
Сумма столбцов (C)	103,2	103,4	103,8	103,6	103,8	102,4		$\sum R^2 = 64109{,}32$
C^2	10650,24	10691,56	10774,44	10732,96	10774,44	10485,76	$\sum C^2 = 64109.40$	

Таблица 16 – Суммы ответов и контрасты

	Стандартный образец $\underline{S}$		Испытуемый препарат $\underline{U}$		Сумма	
Малая доза	$S_1 =$	97,6	$U_1 =$	96,2		
Средняя доза	$S_2 =$	104,6	$U_2 =$	102,8		
Большая доза	$S_3 =$	109,8	$U_3 =$	109,2		
Сумма	$S =$	312,0	$U =$	308,2	$\sum y = S + U =$	620,2
Линейный контраст	$L_S =$	12,2	$L_U =$	13,0	$L_S + L_U =$	25,2
Квадратический контраст	$Q_S =$	–1,8	$Q_U =$	–0,2	$Q_S + Q_U =$	–2,0

Для того чтобы проверить правильность проведенного опыта и вычислить его дисперсию, проводят дисперсионный анализ полученных данных. При этом рассчитывают значения дисперсий для 10 источников дисперсии (см. сводную табл. 17).

Для этого на основании данных, представленных в табл. 15 и 16, а также поправочного коэффициента, вычисляют суммы квадратов источников дисперсии.

Поправочный коэффициент $K = \frac{\left(\sum y\right)^2}{N} = \frac{620{,}2^2}{36} = 10684{,}6678$;

$$Препараты = \frac{S^2 + U^2}{3n} - K = \frac{312{,}0^2 + 308{,}2^2}{18} - 10684{,}6678 = 0{,}401;$$

$$Регрессия = \frac{\left(L_S + L_U\right)^2}{4n} = \frac{25{,}2^2}{24} = 26{,}46 = E;$$

$$Параллельность = \frac{L_S^2 + L_U^2}{2n} - E = \frac{12{,}2^2 + 13{,}0^2}{12} - 26{,}46 = 0{,}027;$$

$$Квадратичность = \frac{(Q_S + Q_U)^2}{6n \cdot 2} = \frac{(-1{,}8 - 0{,}2)^2}{36 \cdot 2} = 0{,}055 = Q;$$

$$Разность\ квадратичностей = \frac{Q_S^2 + Q_U^2}{6n} - Q = \frac{1{,}8^2 + 0{,}2^2}{36} - 0{,}055 = 0{,}0361;$$

$$Обработки = \frac{S_1^2 + S_2^2 + S_3^2 + U_1^2 + U_2^2 + U_3^2}{n} - K =$$

$$= \frac{97{,}6^2 + 104{,}6^2 + 109{,}8^2 + 96{,}2^2 + 102{,}8^2 + 109{,}2^2}{6} - 10684{,}6678 = 26{,}9789;$$

$$Строки = \frac{\sum R^2}{n} - K = \frac{64109{,}32}{6} - 10684{,}6678 = 0{,}2189;$$

$$Столбцы = \frac{\sum C^2}{n} - K = \frac{64109{,}40}{6} - 10684{,}6678 = 0{,}2322;$$

$$Итог = \sum\left(y^2\right) - K = 10713{,}9600 - 10684{,}6678 = 29{,}2922;$$

$Отклонение = итог - обработки - строки - столбцы = 29{,}2922 - 26{,}9789 - 0{,}2189 - 0{,}2322 = 1{,}8622.$

Таблица 17 – Сводная таблица дисперсионного анализа (трехдозовый латинский квадрат)

Источник дисперсии (показатель)	Число степеней свободы (*f*)	Сумма квадратов	Средний квадрат $\left(\frac{сумма\ квадратов}{f}\right)$	Наблюдаемое значение критерия Фишера $F_{набл.}$	Критическое значение критерия Фишера $F_{критич.}$	
Препараты	1	0,401	0,401	4,307		
Регрессия	1	26,46	26,46	284,18	>8,1	(*P*=99 %)
Параллельность	1	0,027	0,027	0,290	<4,35	(*P*=95 %)
Квадратичность	1	0,055	0,055	0,591	<4,35	(*P*=95 %)
Разность квадратичностей	1	0,0361	0,0361	0,3877	<4,35	(*P*=95 %)
Обработки	$k-1=6-1=5=f_{об.}$	26,9789	5,39578			
Строки	$n-1=5=f_{стр.}$	0,2189	0,04378	0,4702	<4,1	(*P*=99 %)
Столбцы	$n-1=5=f_{ст.}$	0,2322	0,04644	0,4988	<4,1	(*P*=99 %)
Отклонение	$N-1-f_{об.}-f_{стр.}-$ $-f_{ст.}-m=20$	1,8622	$0,09311=s^2$			
Итог	$N-1-m=35$	29,2922	0,83692			

$n = 6$ (число ответов на дозу);
$N = 36$ (общее число ответов в опыте);
$m = 0$ (число утраченных и замененных значений).

Значимость различий дисперсий проверяют с помощью критерия Фишера. Обязательным является выполнение требований для показателей *«Регрессия»*, *«Параллельность»*, *«Квадратичность»*, *«Разность квадратичностей»*, *«Строки»* и *«Столбцы»*. Для *«Регрессии»* наблюдаемое значение критерия Фишера должно быть больше критического (*P* = 99 %), а для показателей *«Параллельность»* (*P* = 95 %), *«Строки»* (*P* = 99 %) и *«Столбцы»* (*P* = 99 %) – меньше критического. Показатель *«Регрессия»* характеризует дозозависимость, *«Параллельность»* – параллельность двух линий регрессии, *«Квадратичность»* и *«Разность квадратичностей»* – линейность дозозависимости, а *«Строки»* и *«Столбцы»* – сбалансированность ответов на протяжении всего опыта.

Для того чтобы найти $F_{набл.}$ средние квадраты показателей делят на средний квадрат показателя *«Отклонение»*. Полученные результаты сравнивают с табличными критическими значениями критерия Фишера (приложение, табл. III). Число степеней свободы $f_1 = 1$ или 5, а $f_2 = 20$.

Дисперсионный анализ показал правильность результатов опыта: статистическую значимость дозозависимости (*«Регрессия»*), параллельность двух линий регрессии (*«Параллельность»*), линейность дозозависимости (*«Квадратичность»* и *«Разность квадратичностей»*) и отсутствие статистически значимых различий между строками и столбцами (см. одноименные показатели).

Вычисление биологической активности и ее доверительных границ

Соотношение доз равно 1,5, следовательно $I = \lg 1{,}5 = 0{,}1761$;

$t = 2{,}5638 + 5{,}49059/f + 2{,}72654/f^2 + 31{,}2446/f^3 + 21{,}6745/f^{10} = 2{,}849$,

при $f = 20$ и $P = 99$ %;

$$b = \frac{L_S + L_U}{(3-1)I \cdot 2n} = \frac{25{,}2}{2 \cdot 0{,}1761 \cdot 12} = 5{,}9625;$$

$$\bar{y}_S = \frac{S}{3n} = \frac{312{,}0}{18} = 17{,}333;$$

$$\bar{y}_U = \frac{U}{3n} = 17{,}122;$$

$$M_U^{'} = \frac{\bar{y}_U - \bar{y}_S}{b} = -0{,}03540;$$

Ожидаемая активность $A_U = 1000$ МЕ/мг;

$M_U = M_U^{'} + \lg A_U = 2{,}9646$;

Биологическая активность $R_U = 10^{M_U} = 10^{2{,}9646} = 921{,}722$ МЕ/мг;

$C = E/\left(E - s^2 t^2\right) = 26{,}46/\left(26{,}46 - 0{,}09311 \cdot 2{,}849^2\right) = 1{,}0294.$

Логарифмические доверительные границы биологической активности испытуемого препарата вычисляют по формуле:

$$CM_U^{'} \pm \sqrt{(C-1)\left(CM_U^{'\,2} + I^2\right)} =$$

$$= 1{,}0294 \cdot (-0{,}03540) \pm \sqrt{0{,}0294 \cdot \left(1{,}0294 \cdot 0{,}03540^2 + \frac{8}{3} \cdot 0{,}1761^2\right)}.$$

Логарифмические доверительные границы биологической активности испытуемого препарата составляют – 0,08610 и 0,01325. Нижняя и верхняя доверительная граница составляет $10^{\lg A_U + (-0{,}08610)}$ и $10^{\lg A_U + 0{,}01325}$, т. е. 820,09 и 1030,97 МЕ/мг соответственно.

3.6. Обработка результатов двойного перекреста (на примере биологической активности инсулина методом А и В)

Биологическую активность инсулина определяют по его гипогликемическому действию.

Таблица 18 – Схема двойного перекреста

	ГРУППА 1	ГРУППА 2	ГРУППА 3	ГРУППА 4
I ПОСТАНОВКА (день 1)	s_1	s_2	u_1	u_2
II ПОСТАНОВКА (день 2)	u_2	u_1	s_2	s_1

В качестве ответа животного (y) принимают:

– для кролика – сумму двух концентраций глюкозы в крови через 1 ч и 2,5 ч после инъекции инсулина или среднюю величину, на которую снижается концентрация глюкозы в крови через 1 и 2,5 ч после введения инсулина, выраженную в процентах по отношению к исходной (так называемый средний процент снижения);

– для мыши – концентрацию глюкозы в крови через 40 мин после инъекции.

В обоих случаях схема расчетов одинакова.

В данном подразделе приведен пример обработки результатов двойного перекреста на мышах.

Таблица 19 – Ответы y (концентрация глюкозы (мг%) в крови животных через 40 мин после инъекции инсулина)

Группа 1			Группа 2			Группа 3			Группа 4		
y		Сумма за 2 дня (B)	y		Сумма за 2 дня (B)	y		Сумма за 2 дня (B)	y		Сумма за 2 дня (B)
s_1	u_2		s_2	u_1		u_1	s_2		u_2	s_1	
125	84	209	81	78	159	120	82	202	89	84	173
76	61	137	87	90	177	89	72	161	78	106	184
91	65	156	78	113	191	104	87	191	72	74	146
76	81	157	74	105	179	129	61	190	66	132	198
90	71	161	80	85	165	87	76	163	54	87	141
112	60	172	72	69	141	102	73	175	60	88	148
102	74	176	71	121	192	80	53	133	87	99	186
64	48	112	79	128	207	123	86	209	67	100	167
120	67	187	73	101	174	126	80	206	73	95	168
82	57	139	98	78	176	91	42	133	72	97	169
68	40	108	86	71	157	90	73	163	79	119	198
83	75	158	65	57	122	107	86	193	74	113	187

Таблица 20 – Суммы ответов и контрасты

	Стандартный образец $\underline{S}$	Испытуемый препарат $\underline{U}$	Сумма
День 1			
Малая доза	$S_{1I} = 1089$	$U_{1I} = 1248$	
Большая доза	$S_{2I} = 944$	$U_{2I} = 871$	
Сумма	$S_I = 2033$	$U_I = 2119$	$D_I = 4152$
День 2			
Малая доза	$S_{1II} = 1194$	$U_{1II} = 1096$	
Большая доза	$S_{2II} = 871$	$U_{2II} = 783$	
Сумма	$S_{II} = 2065$	$U_{II} = 1879$	$D_{II} = 3944$
Сумма ответов за 2 дня	$S = 4098$	$U = 3998$	$\sum y = 8096$
Линейные контрасты			
День 1	$L_{SI} = –145$	$L_{UI} = –377$	$L_I = –522$
День 2	$L_{SII} = –323$	$L_{UII} = –313$	$L_{II} = –636$
Сумма	$L_S = –468$	$L_U = –690$	$\sum L = -1158$

Для того чтобы проверить правильность проведенного опыта и вычислить его дисперсию, проводят дисперсионный анализ полученных данных. При этом рассчитывают значения дисперсий для 11 показателей (см. сводную табл. 21).

Для этого на основании данных, представленных в табл. 19 и 20, а также поправочного коэффициента, вычисляют суммы квадратов источников дисперсии.

Поправочный коэффициент $K = \dfrac{\left(\sum y\right)^2}{N} = \dfrac{8096^2}{96} = 682762{,}67;$

$$\textit{Итог} = \sum (y)^2 - K = 721262{,}00 - 682762{,}67 = 38499{,}33;$$

$$\textit{Блоки} = \frac{\sum (B)^2}{2} - K = \frac{209^2 + 137^2 + \ldots + 187^2}{2} - 682762{,}67 = 14967{,}33;$$

$$\textit{Препараты} = \frac{S^2 + U^2}{2n} - K = \frac{4098^2 + 3998^2}{48} - 682762{,}67 = 104{,}16;$$

$$\textit{Дни} = \frac{D_I^2 + D_{II}^2}{2n} - K = \frac{4152^2 + 3944^2}{48} - 682762{,}67 = 450{,}66;$$

$$\textit{Регрессия} = \frac{(L_S + L_U)^2}{N} = \frac{(-1158)^2}{96} = 13968{,}38 = E;$$

$$\textit{Параллельность} = \frac{L_S^2 + L_U^2}{2n} - E = \frac{468^2 + 690^2}{48} - 13968{,}38 = 513{,}37;$$

$$Дни \times регрессию = \frac{L_I^2 + L_{II}^2}{2n} - E = \frac{522^2 + 636^2}{48} - 13968{,}38 = 135{,}37;$$

$$Дни \times параллельность = \frac{L_{SI}^2 + L_{SII}^2 + L_{UI}^2 + L_{UII}^2}{n} - E - параллельность -$$

$$-(дни \times регрессию) = \frac{145^2 + 323^2 + 377^2 + 313^2}{24} - 13968{,}38 - 513{,}37 - 135{,}37 = 610{,}05;$$

$$Дни \times препараты = \frac{S_I^2 + S_{II}^2 + U_I^2 + U_{II}^2}{n} - K - дни - препараты =$$

$$= \frac{2033^2 + 2065^2 + 2119^2 + 1879^2}{24} - 682762{,}67 - 450{,}66 - 104{,}16 = 770{,}68;$$

$$Отклонение(1) = блоки - параллельность - (дни \times препараты) - (дни \times регрессию) =$$

$$= 13547{,}91;$$

$$Отклонение(2) = итог - блоки - препараты - регрессия - дни -$$

$$-(дни \times параллельность) = 8398{,}75.$$

Таблица 21 – Сводная таблица дисперсионного анализа (двойной перекрест)

Источник дисперсии (показатель)	Число степеней свободы (*f*)	Сумма квадратов	Средний квадрат $\left(\frac{сумма\ квадратов}{f}\right)$	Наблюдаемое значение критерия Фишера $F_{набл.}$	Критическое значение критерия Фишера $F_{критич.}$
Параллельность	1	513,37	513,37	1,67	<4,06 (*P*=95 %)
Дни × препараты	1	770,68	770,68	2,50	<4,06 (*P*=95 %)
Дни × регрессию	1	135,37	135,37	0,44	<4,06 (*P*=95 %)
Отклонение (1)	$\frac{N}{2} - 4 - m = 44$	13547,91	307,91		
Блоки	$2n - 1 = 47$	14967,33	318,45		
Препараты	1	104,16	104,16	0,55	<4,06 (*P*=95 %)
Регрессия	1	13968,38	13968,38	73,18	>7,24 (*P*=99 %)
Дни	1	450,66	450,66	2,36	<4,06 (*P*=95 %)
Дни × параллельность	1	610,05	610,05	3,20	<4,06 (*P*=95 %)
Отклонение (2) (дисперсия опыта)	$\frac{N}{2} - 4 - m = 44$	8398,75	190,88		
Итог	$N - 1 - m = 95$	38499,33			

$N = 96$ (общее число ответов в опыте);
$n = 24$ (число ответов в группе);
$m = 0$ (число утраченных и замененных значений).

Значимость различий дисперсий проверяют с помощью критерия Фишера. Обязательным является выполнение требований для показателей *«Регрессия»* и *«Дни × параллельность»*. *«Регрессия»* характеризует дозозависимость, а *«Дни × параллельность»* – показатель групповой

устойчивости, характеризующий согласованность углов наклона линий дозозависимости в первый и второй день. Для *«Регрессии»* наблюдаемое значение критерия Фишера должно быть больше критического (P = 99 %), а для показателя *«Дни × параллельность»* – меньше критического (P = 95 %).

Для того чтобы найти $F_{\text{набл.}}$, средние квадраты показателей *«Параллельность»*, *«Дни × препараты»* и *«Дни × регрессию»* делят на средний квадрат показателя *«Отклонение (1)»*, а все остальные – на средний квадрат *«Отклонения (2)»*. Полученные результаты сравнивают с табличными критическими значениями критерия Фишера (приложение, табл. III). Число степеней свободы $f_1 = 1$, а $f_2 = 44$.

Вычисление биологической активности и ее доверительных границ

Соотношение доз равно 2,667, следовательно $I = \lg 2{,}667 = 0{,}4260$;

$t = 1{,}958788 + 2{,}429953/f + 2{,}189891/f^2 + 4{,}630189/f^3 + 1{,}398179/f^9 = 2{,}02$ (f = 44 и P = 95 %);

$$b = \frac{2\,(L_S + L_U)}{IN} = \frac{2(-468 - 690)}{0{,}4260 \cdot 96} = -56{,}63;$$

$$\overline{y}_S = \frac{S}{2n} = \frac{4098}{48} = 85{,}38;$$

$$\overline{y}_U = \frac{U}{2n} = 83{,}29;$$

$$M'_U = \frac{\overline{y}_U - \overline{y}_S}{b} = 0{,}0369;$$

$$A_u = 100 \text{ ЕД/мл};$$

$$M_U = M'_U + \lg A_U = 2{,}0369;$$

Биологическая активность $R_U = 10^{2{,}0369} = 108{,}87$ ЕД/мл;

$C = E/\left(E - s^2 t^2\right) = 13968{,}38/\left(13968{,}38 - 190{,}88 \cdot 2{,}02^2\right) = 1{,}0591.$

Логарифмические доверительные границы биологической активности испытуемого препарата вычисляют по формуле:

$$CM'_U \pm \sqrt{(C-1)\left(CM'^{\,2}_U + I^2\right)} + \lg A_U =$$

$$= 1{,}0591 \cdot 0{,}0369 \pm \sqrt{0{,}0591 \cdot \left(1{,}0591 \cdot 0{,}0369^2 + 0{,}4260^2\right)} + 2{,}000.$$

Логарифмические доверительные границы биологической активности испытуемого препарата составляют 1,9351 и 2,1431.

Таким образом, биологическая активность испытуемого препарата равна 108,9 ЕД/мл. Ее доверительные границы составляют $10^{1,9351}$ – $10^{2,1431}$, т. е. 86,1 – 139,0 ЕД/мл.

3.7. Статистическая обработка результатов испытания на гистамин

При определении содержания гистамина в лекарственных препаратах в качестве тест-объекта применяют изолированную подвздошную кишку морской свинки, а в качестве ответа – величину ее изотонического сокращения в ответ на введение стандартного образца и испытуемого препарата. Эти сокращения регистрируют в виде амплитуды перемещения писчика механического рычага или пера электронного самописца (см или мм).

Таблица 22 – Учет результатов (первичные данные)

	Стандартный образец (гистамина дигидрохлорид)		Испытуемый препарат (ИП) или его разведение
	Разведение 3	*Разведение 1*	
Концентрация гистамина дигидрохлорида, г/мл	$5{,}00 \cdot 10^{-6}$	$1{,}25 \cdot 10^{-6}$	
Логарифм концентрации гистамина дигидрохлорида	–5,301	–5,903	
Высота пика, мм	25,5 30,0 27,5 28,5 24,5	14,0 11,0 10,0 11,5 8,5	17,5 19,5 19,0 12,0 16,0
Среднее значение, см	27,2	11,0	16,8 (y)

1) Для каждого разведения стандартного образца и ИП получают не менее 4 пиков, измеряют их высоту (см.табл. 22).

2) Вычисляют параметры уравнения линейной регрессии (систематическую погрешность и коэффициент регрессии) для зависимости ответа изолированного органа (высоты пика) от логарифма концентрации стандартного образца:

$a = 169{,}8381,$

$b = 26{,}9076,$

где a – свободный член линейной регрессии (отрезок между началом координат и точкой пересечения линии регрессии с осью ординат);

b – угловой коэффициент линейной регрессии (тангенс угла наклона линии регрессии).

3) Вычисляют, какой концентрации гистамина в пересчете на стандартный образец соответствует средний ответ на введение ИП:

$$y = a + bx$$

$$16{,}8 = 169{,}8381 + 26{,}9076x$$

$x = \frac{y-a}{b} = \frac{16{,}8 - 169{,}8381}{26{,}9076} = -5{,}688$ (логарифм концентрации гистамина в ИП в пересчете на стандартный образец).

$10^x = 10^{-5{,}688} = 2{,}05 \cdot 10^{-6}$ (г/мл) гистамина в ИП в пересчете на стандартный образец.

4) Коэффициент пересчета с гистамина дигидрохлорида на гистамин-основание равен 0,6038, следовательно:

$0{,}6038 \cdot 2{,}05 \cdot 10^{-6} = 1{,}2378 \cdot 10^{-6}$ (г/мл) гистамина-основания в ИП.

ИП считают прошедшим испытание, если содержание гистамина-основания в неразведенном ИП не превышает максимально допустимое нормативным документом.

3.8. Обработка результатов испытания на пролонгированное (удлиненное) действие лекарственных препаратов инсулина и его аналогов

Пролонгированное действие препаратов инсулина определяют путем сравнения их гипогликемического действия с действием раствора стандартного образца инсулина после подкожной инъекции. В качестве тест-объекта используют кроликов, а в качестве ответа – концентрацию глюкозы в крови через 1,0; 1,5; 3,5 и 6,0 ч после введения в % от исходного уровня.

Таблица 23 – Ответы (концентрация глюкозы в крови кроликов в мг%)

Стандартный образец *S*						
	Время, ч					
№ п/п	0	1,5	3	4,5	6	
1	119	30	33	66	115	
2	84	19	43	75	90	
3	85	32	37	55	87	
4	73	43	40	49	81	
5	91	24	71	83	95	
6	82	48	48	57	75	
7	91	21	36	48	92	
8	95	44	47	65	111	
9	93	25	20	65	95	
						Сумма
Среднее, мг%	90,33	31,78	41,67	62,56	93.44	319,78
Среднее, %	100,00	35,18	46,13	69,26	103.44	*n* = 9
Среднее снижение, %		64,82	53,87	30,74	–3,44	

Испытуемый препарат *U*

	Время, ч					
№ п/п	0	1,5	3	4,5	6	
1.	89	41	48	54	74	
2.	102	36	41	43	68	
3.	83	36	45	57	72	
4.	82	47	20	34	61	
5.	94	62	56	93	34	
6.	79	40	41	52	48	
7.	97	19	34	42	79	
8.	110	47	44	89	73	
9.	62	35	36	40	44	
						Сумма
Среднее, мг%	88,67	40,33	40,56	56,00	61.44	287,00
Среднее, %	100,00	45,48	45,74	63,16	69.29	*n* = 9
Среднее снижение, %		54,52	54,26	36,84	30,71	

Для каждого кролика в каждой временной точке рассчитывают индивидуальную относительную концентрацию глюкозы в крови в процентах от исходного уровня данного животного.

Таблица 24 – Концентрация глюкозы в крови животных (%) от исходного уровня

Стандартный образец *S*					
	Время, ч				
№ п/п	0	1,5	3	4,5	6
1	100,00	25,21	27,73	55,46	96,64
2	100,00	22,62	51,19	89,29	107,14
3	100,00	37,65	43,53	64,71	102,35
4	100,00	58,9	54,79	67,12	110,96
5	100,00	26,37	78,02	91,21	104,4
6	100,00	58,54	58,54	69,51	91,46
7	100,00	23,08	39,56	52,75	101,1
8	100,00	46,32	49,47	68,42	116,84
9	100,00	26,88	21,51	69,89	102,15
Среднее	100,00	36,17	47,15	69,82	103,67
n		9	9	9	9
f		8	8	8	8
s		14,915	16,838	13,085	7,486
t		2,306	2,306	2,306	2,306
Δx, P = 95 %		11,46	12,94	10,06	5,75
Испытуемый препарат *U*					
	Время, ч				
№ п/п	0	1,5	3	4,5	6
1	100,00	46,07	53,93	60,67	83,15
2	100,00	35,29	40,2	42,16	66,67
3	100,00	43,37	54,22	68,67	86,75
4	100,00	57,32	24,39	41,46	74,39
5	100,00	65,96	59,57	98,94	36,17
6	100,00	50,63	51,9	65,82	60,76
7	100,00	19,59	35,05	43,3	81,44
8	100,00	42,73	40	80,91	66,36
9	100,00	56,45	58,06	64,52	70,97
Среднее	100,00	46,38	46,37	62,94	69,63
n		9	9	9	9
f		8	8	8	8
s		13,628	11,99	19,192	15,238
t		2,306	2,306	2,306	2,306
Δx, P = 95 %		10,48	9,22	14,75	11,71

Так как в течение 6 ч средняя относительная концентрация глюкозы в крови кроликов, получивших раствор стандартного образца, достигла 103,7 %, то в качестве контрольной точки принимают время, когда она достигла 100 % (между 4,5 и 6 ч).

1. Расчет контрольной временной точки:

1.1. У группы кроликов, получивших стандартный образец, вычисляют изменение средней относительной концентрации глюкозы в крови на

завершающем этапе опыта. Для этого вычисляют разность между средними значениями относительной концентрации глюкозы в крови группы животных, получивших раствор стандартного образца, через 6и 4,5 ч после введения:

$$103{,}67 - 69{,}82 = 33{,}85\ (\%).$$

1.2. Разность между средним исходным уровнем и средней концентрацией глюкозы через 4,5 ч после введения:

$$100{,}00 - 69{,}82 = 30{,}18\ (\%).$$

1.3. Составляют следующую пропорцию:

$1{,}50$ ч $\rightarrow 33{,}85\,\%$

x ч $\rightarrow 30{,}18\,\% \Rightarrow x = \dfrac{30{,}18 \cdot 1{,}50}{33{,}85} = 1{,}34\ (\text{ч})$ прошло от 4,5 ч до контрольной точки.

1.4. Контрольная временная точка равна: 4,50 +1,34 = 5,84 (ч).

2. Для каждого животного рассчитывают относительную концентрацию глюкозы в крови в контрольной временной точке. Например, для кролика № 1 в первой группе:

2.1. 96,64 – 55,46 = 41,18 (%) за 1,5 ч с 4,5 до 6 ч.

Следовательно, за время, прошедшее от 4,5 до 5,84 ч концентрация глюкозы в крови данного животного возросла на:

$$\frac{1{,}34 \cdot 41{,}18}{1{,}50} = 36{,}79\ (\%)$$

2.2. Поэтому, концентрация глюкозы в крови кролика № 1 в контрольной временной точке составила 55,46 + 36,79 = 92,25 (%).

Такие же расчеты проводят и для остальных животных. Полученные результаты переносят в следующую табл. 25.

Таблица 25 – Результаты определения пролонгированного действия

Стандартный образец (*S*)				Испытуемый препарат (*U*)			
0	4,5 ч	6 ч	Контрольная точка 5,84 ч	0	4,5	6 ч	Контрольная точка 5,84 ч
100,00	55,46	96,64	92,25	100,00	60,67	83,15	80,75
100,00	89,29	107,14	105,24	100,00	42,16	66,67	64,06
100,00	64,71	102,35	98,34	100,00	68,67	86,75	84,82
100,00	67,12	110,96	106,28	100,00	41,46	74,39	70,88
100,00	91,21	104,4	102,99	100,00	98,94	36,17	42,87
100,00	69,51	91,46	89,12	100,00	65,82	60,76	61,3

100,00	52,75	101,1	95,94	100,00	43,3	81,44	77,37
100,00	68,42	116,84	111,68	100,00	80,91	66,36	67,91
100,00	69,89	102,15	98,71	100,00	64,52	70,97	70,28
100,00	**69,82**	**103,67**	**100,06≈100,00**	**100,00**	**62,94**	**69,63**	**68,92**
			$s^2 = 51{,}446$				$s^2 = 153{,}895$

Для того чтобы проверить равенство дисперсий в двух группах, делят бóльшую дисперсию на меньшую: $s_1^2 / s_2^2 = 153{,}895/51{,}446 \approx 2{,}99$, что меньше критического значения критерия Фишера для $f_1 = f_2 = 8$ и P = 95%, равного 3,44 (приложение, табл. III). Это значит, что различие двух дисперсий статистически недостоверно. Поэтому проводят сравнение двух средних значений относительной концентрации глюкозы в крови двух групп животных с помощью критерия Стьюдента по формуле:

$$t_{\text{набл.}} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\frac{s_1^2 f_1 + s_2^2 f_2}{f_1 + f_2}}} \sqrt{\frac{n_1 n_2}{n_1 + n_2}} = 6{,}519, \text{ где } f = n_i - 1;$$

$t_{\text{критич.}} = 1{,}958788 + 2{,}429953/f + 2{,}189891/f^2 + 4{,}630189/f^3 + 1{,}398179/f^9 \approx 2{,}120$, при $f = n_1 + n_2 - 2 = 16$ и P = 95 %.

Это говорит о том, что в контрольное время (5,84 ч) средняя относительная концентрация глюкозы в крови кроликов, получивших испытуемый препарат, была достоверно ниже, чем таковая в крови животных, получивших раствор стандартного образца, что свидетельствует о наличии пролонгированного действия испытуемого препарата.

Результаты опыта в графическом виде приведены на рисунке.

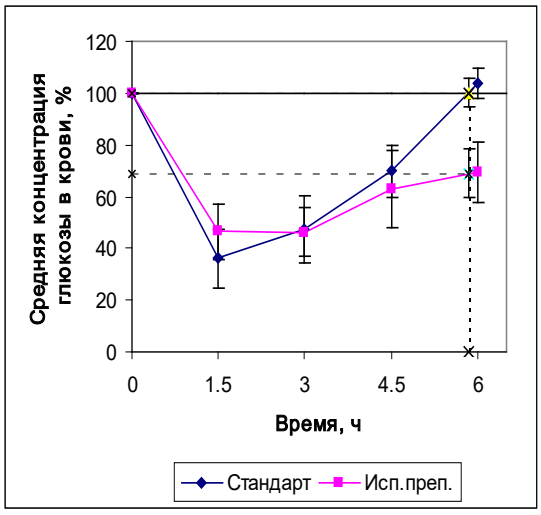


Рисунок − Гипогликемические кривые кроликов в % от исходного уровня (определение пролонгированного действия).

Примечание. Если s_1^2/s_2^2 превышает критическое значение критерия Фишера, то для вычисления наблюдаемого значения критерия Стьюдента следует применять формулу:

$$t_{\text{набл.}} = \frac{\left|\overline{x}_1 - \overline{x}_2\right|}{\sqrt{s_1^2/n_1 + s_2^2/n_2}} \text{ при } f = \left(n_1 + n_2 - 2\right)\left(0{,}5 + \frac{s_1^2 + s_2^2}{s_1^4 + s_2^4}\right).$$

Вычисленное значение $t_{\text{набл.}}$ сравнивают с $t_{\text{критич.}}$, как указано выше (число степеней свободы f округляют до целого числа). Критическое значение критерия Стьюдента можно также найти в приложениях (табл. II).

3.9. Четырехпараметрический метод анализа S-образных кривых дозозависимости

Данный метод применяют для определения биологической активности иммунобиологических препаратов.

Кривая дозозозависимости как стандартного образца, так и испытуемого препарата характеризуется 4 параметрами:

– верхнее плато (α);

– нижнее плато (δ);

– коэффициент наклона (β);

– расстояние между кривыми по оси x (γ).

Зависимость ответа u от натурального логарифма дозы x выражают следующей формулой:

$$u = \delta + \frac{\alpha - \delta}{1 + e^{-\beta(x-\gamma)}}$$

Кривые стандартного образца и испытуемого препарата можно сравнивать при одинаковом наклоне, а также одинаковом уровне верхнего и нижнего плато. Таким образом, кривые должны различаться только по параметру γ, который является показателем активности испытуемого препарата. Равенство трех остальных параметров доказывают при валидации методики для рутинных испытаний. Повторная проверка равенства данных параметров необходима только при изменении условий испытания.

Четырехпараметрический метод реализован в специальном биометрическом программном обеспечении (например, CombiStats, PLA).

В случае отсутствия такого программного обеспечения, можно выбрать линейные участки кривых и сравнить их с помощью метода трехдозовой рандомизированной постановки (3.2).

4. БИОЛОГИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ, ОСНОВАННЫЕ НА АЛЬТЕРНАТИВНОМ ОТВЕТЕ

4.1. Оценка и сравнение пороговых доз при их прямом определении

При испытаниях некоторых лекарственных средств результат их действия учитывают не в количественной, а в альтернативной форме (наличие или отсутствие эффекта – гибели, судорог и т. д., иногда это называют реакцией «все или ничего»). В ряде случаев может быть получена величина эффективной (пороговой) дозы ED для каждого отдельного испытуемого препарата: фиксируют ту дозу, при которой получается ожидаемый эффект. Тогда оценкой эффективной дозы для данного испытуемого препарата может служить среднее значение по достаточно большой группе животных. При расчетах найденные индивидуальные эффективные дозы ED заменяют их логарифмами x=lgED, ибо распределение этих логарифмов обычно ближе к нормальному, чем распределение самих доз. После того как вычислены значения:

$$\bar{x} = \sum x / n ;$$

$$x_{н,в} = x \pm t(p,f) s_{\bar{x}} = x \pm t(p,f) \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n(n-1)}} ,$$

находят доверительные границы для эффективной дозы:

$$\mathrm{ED}_{\text{н,в}} = 10^{x_{\text{н,в}}}.$$

Величину $t(p,f)$ ищут для числа степеней свободы $f = n - 1$.

Вычисление эквивалентной эффективной дозы и ее доверительных границ производят по формулам:

$$M = \bar{x} - \bar{x}^0 ;$$

$$M_{н,в} = M \pm t(p,f)s\sqrt{\frac{1}{n^0}+\frac{1}{n}};$$

$$\bar{x}^0 = \sum x^0 / n^0;$$

$$\bar{x} = \sum x / n;$$

$$s = \sqrt{\frac{\sum\left(x^0 - \bar{x}\right)^2 + \sum\left(x - \bar{x}\right)^2}{n^0 + n - 2}},$$

а t (P, f) ищут для числа степеней свободы $f = n^0 + n - 2$. Доверительные границы для отношения эквивалентных эффективных доз равны:

$$(\mathrm{ED}^0/\mathrm{ED})_{\text{н,в}} = 10^{2\pm M_{\text{н,в}}}$$

Если рассматриваемый эффект не является необратимым, то лучше использовать одну группу тест-объектов, применяя к каждому из них сначала 1 испытуемый препарат, а затем после интервала, необходимого для полного восстановления начального состояния, другой. Получив для каждого тест-объекта разность логарифмов пороговых доз $\Delta = x - x^0$, вычисляют:

$$M = \bar{\Delta} = \sum \Delta / n,$$

$$M_{н,в} = M \pm t_p \sqrt{\sum\left(\Delta - \bar{\Delta}\right)^2 / n(n-1)},$$

причем t(P, f) ищут для числа степеней $f = n - 1$. Такая постановка испытания позволяет уменьшить влияние изменчивости исходных состояний и параметров тест-объектов и приводит к сужению доверительных интервалов. При этом целесообразно разбить группу тест-объектов на 2 примерно равные подгруппы с тем, чтобы одна из них получала сначала стандартный образец, а затем испытуемый препарат, а другая подгруппа – наоборот. Этим обеспечивается лучшая рандомизация.

4.1.1. Обработка результатов оценки активности испытуемого препарата по сравнению со стандартным образцом на кошках

Из полученных в опыте данных вычисляют величину смертельной дозы испытуемого препарата для каждого животного в миллилитрах на 1 кг массы тела (Y). Находят величину средней смертельной дозы для стандартного

образца и испытуемого препарата ($\overline{Y}_S$ и $\overline{Y}_U$ соответственно), а также их стандартные отклонения s_S и s_U, вычисленные по следующим формулам:

$$S^2 = \frac{\sum_1^n x_i^2 - n \cdot \bar{x}^2}{f}, \text{ где } f = n - 1;$$

$$s = \sqrt{s^2};$$

$$s_{\bar{x}} = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

Результаты опытов удовлетворяют требованиям метода, если отношение стандартного отклонения среднего результата $S_{\overline{Y}}$ к средней смертельной дозе $\overline{Y}$ не превышает 5,7 %. В противном случае необходимо увеличить число опытов.

Испытуемый препарат считают прошедшим испытание, если отношение средних смертельных доз стандартного образца и испытуемого препарата составляет 90 – 110 %, а их разность не превышает величины $S_d \cdot t$.

Стандартное отклонение разности рассчитывают по формуле:

$$s_d = \sqrt{\frac{\sum\left(Y_S - \overline{Y}_S\right)^2 + \sum\left(Y_U - \overline{Y}_U\right)^2}{n_S + n_U - 2} \cdot \frac{n_S + n_U}{n_S n_U}}.$$

Критическое значение критерия Стьюдента t для числа степеней свободы $f = n_S + n_U - 2$ при P = 95 % вычисляют как в предыдущих разделах или находят в табл. II приложения.

Таблица 26 – Определение биологической активности сердечных гликозидов на кошках по сравнению со стандартным образцом (пример 5)

№ п/п	Стандартный образец			Испытуемый препарат		
	Y_S, мл/кг	$\lvert Y_S - \overline{Y}_S \rvert$	$\left(Y_S - \overline{Y}_S\right)^2$	Y_U, мл/кг	$\lvert Y_U - \overline{Y}_U \rvert$	$\left(Y_U - \overline{Y}_U\right)^2$
1	15,0	3,5	4,00	16,0	2,5	6,25
2	16,3	2,2	0,49	17,1	1,4	1,96
3	18,2	0,3	1,44	20,0	1,5	2,25
4	17,8	0,7	0,64	19,5	1,0	1,00
5	17,0	1,5	0,00	20,0	1,5	2,25
6	17,7	0,8	0,49	18,4	0,1	0,01

$\overline{Y}_S = 17{,}0$ (мл/кг) $\qquad \sum\left(Y_S - \overline{Y}_S\right)^2 = 7{,}06$;

$\overline{Y}_U = 18{,}5$ (мл/кг) $\qquad \sum\left(Y_U - \overline{Y}_U\right)^2 = 13{,}72$;

$$S_{\bar{Y}_S} = \frac{s_S}{\sqrt{n_S}} = \frac{\sqrt{7{,}06/(6-1)}}{\sqrt{6}} = 0{,}48$$ (мл/кг);

$$S_{\bar{Y}_U} = \frac{s_U}{\sqrt{n_U}} = \frac{\sqrt{13{,}72/(6-1)}}{\sqrt{6}} = 0{,}68$$ (мл/кг).

Отношение стандартного отклонения среднего результата к средней смертельной дозе для стандартного образца и испытуемого препарата соответственно:

$$\frac{S_{\bar{Y}_S} \cdot 100}{\bar{Y}_S} = \frac{0{,}48 \cdot 100\%}{17} = \pm 2{,}8\%;$$

$$\frac{S_{\bar{Y}_U} \cdot 100}{\bar{Y}_U} = \frac{0{,}68 \cdot 100\%}{18{,}5} = \pm 3{,}68\%.$$

Из полученных данных видно, что значения этих отношений меньше 5,7 %. Следовательно, число проведенных опытов достаточно.

Активность испытуемого препарата составляет:

$$\frac{17{,}0 \cdot 100\%}{18{,}5} = 91\%.$$

Среднее отклонение разности равно:

$$s_d = \sqrt{\frac{7{,}06 + 13{,}72}{12-2} \cdot \frac{12}{36}} = 0{,}8 \text{ (мл/кг)}.$$

Величина t при $f = 12–2 = 10$ и $P = 95$ % равна 2,23.

Следовательно:

$$s_d \cdot t = 0{,}8 \cdot 2{,}23 = 1{,}78 \text{ мл/кг}.$$

Так как разность средних смертельных доз составляет 1,5 мл/кг и меньше величины $s_d \cdot t$, равной 1,78, а активность испытуемого препарата составляет 91 %, испытуемый препарат следует считать удовлетворяющим по своей активности предъявляемым требованиям.

4.2. Оценка биологической активности испытуемого препарата при косвенном определении эффективных доз (оценка ED_{50})

Чаще всего прямое определение эффективной (пороговой) дозы для отдельного животного невозможно, и тогда количественной характеристикой активности испытуемого препарата в каждом опыте служит доля (процент) тест-объектов, давших положительный ответ. Зависимость этой доли от дозы имеет всегда вид *S*-образной несимметричной кривой, которая при замене доз их логарифмами обычно становится более или менее симметричной. В качестве показателя, характеризующего биологическую активность испытуемого препарата в целом, чаще всего принимается та доза, которая вызывает эффект у 50 % тест-объектов; ее называют 50 %-й эффективной

дозой и обозначают ED_{50} (в частности, для токсинов употребляется 50-процентная летальная доза LD_{50}).

Для нахождения ED_{50} следует поставить опыты с несколькими (не менее 3) группами тест-объектов (как правило, не менее 6 в каждой группе) при разных дозах. Интервал используемых доз должен обеспечивать достаточно широкий диапазон положительных ответов (примерно от 20 до 80 %). После получения процентов p_i, положительных ответов для каждой из доз D_i, они заменяются так называемыми пробитами y_i согласно табл. V приложения. Смысл этой замены состоит в том, что зависимость между пробитами y_i, и логарифмами доз $x_i = \lg D_i$ обычно близка к линейной. Эта близость соблюдается тем лучше, чем ближе значение p_i к 50 %, поэтому для каждой из групп вводится весовой коэффициент w_i зависящий от p_i; значения W_i приведены в табл. VI приложения.

*4.2.1. Определение средней смертельной дозы (**LD_{50}**)*

LD_{50} – доза, при которой погибает половина животных. В опыт взяли 4 группы белых мышей по 6 животных в каждой[7)].

Таблица 27 – Учет результатов опыта (яд гюрзы)

Доза, мг/кг (D)	Число погибших животных в группе	Число животных в группе	% погибших животных в группе	Пробит (P)	Весовой коэффициент (W)
2,50	0	6	0	3,27	1,54
3,75	3	6	50	5,00	5,00
5,00	5	6	83,3	5,962	3,576
6,25	6	6	100	6,73	1,54
				$\sum$	11,656

Пробиты и соответствующие им весовые коэффициенты см. табл. V, VI и VII в приложении.

Таблица 28

	DW	PW	D^2W	PWD
	3,850	5,036	9,625	12,590
	18,750	25,000	70,313	93,750
	17,880	21,320	89,400	106,601
	9,625	10,364	60,156	64,776

[7)] Равное число животных в группах и равный интервал доз желателен, но не обязателен.

	DW	PW	D^2W	PWD
$\sum$	50,105	61,720	229,494	277,717

Вычисляют LD_{50}:

$$A_1 = \left(\sum PWD - \frac{\sum DW \times \sum PW}{\sum W} \right) \Bigg/ \left(\sum D^2W - \frac{\left(\sum DW\right)^2}{\sum W} \right) =$$

$$= \left(277{,}717 - \frac{50{,}105 \times 61{,}720}{11{,}656} \right) \Bigg/ \left(229{,}494 - \frac{50{,}105^2}{11{,}656} \right) = 0{,}879;$$

$$A_0 = \frac{\sum PW - \sum DW \cdot A_1}{\sum W} = \frac{61{,}720 - 50{,}105 \cdot 0{,}879}{11{,}656} = 1{,}517\,.$$

$n = 12$ (общее число животных в группах, в которых наблюдался эффект от 6,66 до 93,33 %). В данном случае, в этот теоретический интервал попадают группы, получившие 3,75 и 5,00 мг/кг.

Число степеней свободы $f = n - 1 = 11$;

$$t = 1{,}958788 + 2{,}429953/f + 2{,}189891/f^2 + 4{,}630189/f^3 + 1{,}398179/f^9 \approx 2{,}201,$$
$$(P = 95\ \%;\ f = 11);$$

$$\mathrm{LD}_{50} = \frac{5 - A_0}{A_1} = 3{,}962\ (\text{мг/кг});$$

$$\mathrm{LD}_{84} = \frac{6 - A_0}{A_1} = 5{,}100\ (\text{мг/кг});$$

$$\mathrm{LD}_{16} = \frac{4 - A_0}{A_1} = 2{,}825\ (\text{мг/кг});$$

$$\mathrm{LD}_{10} = \frac{3.72 - A_0}{A_1} = 2{,}506\ (\text{мг/кг});$$

$$\mathrm{s} = \frac{\mathrm{LD}_{84} - \mathrm{LD}_{16}}{\sqrt{2\mathrm{n}}} = \frac{5{,}100 - 2{,}825}{\sqrt{24}} = 0{,}464;$$

Нижняя доверительная граница (P = 95 %) = $LD_{50} - st$ = 3,962 – 0,464 · 2,201 = 2,941;

Верхняя доверительная граница (P = 95 %) = $LD_{50} + st$ = 3,962 – 0,464 · 2,201 = 4,983.

4.3. Сравнение ЛД$_{50}$ двух испытуемых препаратов

Испытуемый препарат 1	Испытуемый препарат 2
$\mathrm{LD}_{50} = 3{,}962\ (\text{мг/кг})$	$\mathrm{LD}_{50} = 2{,}632\ (\text{мг/кг})$

Доверительные границы
2,941 – 4,983 мг/кг

$n = 12$, $f = 11$, $P = 95\%$

$s = 0{,}464$

Доверительные границы
2,034 – 3,230 мг/кг

$n = 24$, $f = 23$, $P = 95\%$

$s = 0{,}289$

$$f = n_1 + n_2 - 2 = 12 + 24 - 2 = 34$$

$$t_{\text{набл.}} = \frac{\left|\text{LD}_{50(1)} - \text{LD}_{50(2)}\right|}{\sqrt{s_1^2 + s_2^2}} = \frac{|3{,}962 - 2{,}632|}{\sqrt{0{,}464^2 + 0{,}289^2}} = 2{,}433$$

$t_{\text{критич.}} = 2{,}0346$ ($f = 34$, $P = 95$ %)

Разность $d = \left|\text{LD}_{50_2} - \text{LD}_{50_1}\right| = 1{,}330$ (мг/кг);

Стандартное отклонение этой разности $s_d = \sqrt{0{,}464^2 + 0{,}289^2} = 0{,}547$;

$t = 2{,}0346$ при $f = n_1 + n_2 - 2 = 34$ и $P = 95$ %, следовательно, нижняя доверительная граница разности равна $d - ts_d = 1{,}330 - 2{,}0346 \cdot 0{,}547 = 0{,}217$, а верхняя доверительная граница равна $d + ts_d = 2{,}443$ (мг/кг).

Из того, что $t_{\text{набл.}} > t_{\text{критич.}}$ и доверительные границы d являются положительными величинами, следует, что LD_{50} испытуемого препарата 1 и испытуемого препарата 2 статистически значимо различаются (P = 95 %).

4.4. Качественное сравнение испытуемых препаратов

Когда какой-либо испытуемый препарат изучают (например, по зависимости доза-эффект) при наличии другого испытуемого препарата с аналогичным действием, может возникнуть необходимость сравнения их эффективности при сопоставимых дозах (обычно при ED_{50} для каждого). Может потребоваться доказательство эффективности испытуемого препарата по сравнению с плацебо.

Составляют следующую таблицу:

Таблица 32 – Схема качественного сравнения двух препаратов

Препарат	–	+	Сумма
Испытуемый препарат 1	*a*	*b*	*a* + *b*

Испытуемый препарат 2	c	d	$c + d$
Сумма	$a + c$	$b + d$	n

«+» и «–» – тест-объекты, давшие соответственно положительный и отрицательный ответ при действии испытуемого препарата, а a, b, c и d – их число.

Число степеней свободы f равно 1, поэтому критические значения критерия Пирсона $\chi^2_{\text{критич.}} = 3{,}84$ (P = 95 %); $\chi^2_{\text{критич.}} = 6{,}63$ (P = 99 %); $\chi^2_{\text{критич.}} = 10{,}83$ (P = 99,9 %) являются константами. Наблюдаемое значение критерия вычисляют по следующей формуле:

$$\chi^2_{\text{набл.}} = \frac{\left(|ad - bc| - n/2\right)^2}{(a+b)(c+d)(a+c)(b+d)} \cdot n$$

Пример 6. Для проверки эффективности вакцины против туберкулеза телятам сначала делали либо предохранительную прививку, либо прививку контрольных средств, а затем заражали микобактериями туберкулеза. С вакцинацией заболели 6 из 20 животных, а без вакцинации – 16 из 19.

Таблица 33 – Проверка эффективности вакцины против туберкулеза

	–	+	Сумма
С вакцинацией	14	6	20
Без вакцинации	3	16	19
Сумма	17	22	39

$$\chi^2 = \frac{\left(|14 \cdot 16 - 6 \cdot 3| - 39/2\right)^2}{20 \cdot 19 \cdot 17 \cdot 22} \cdot 39 = 9{,}54\,.$$

Это значение превышает критическое значение $\chi^2 = 6{,}63$ (P = 95 %; f = 1), поэтому вакцину следует признать эффективной.

Если значение a, b, c или d меньше 3, применение критерия Пирсона не рекомендуется. В таких случаях используют формулу Фишера:

$$P = \frac{(a+b)!(c+d)!(a+c)!(b+d)!}{n!a!b!c!d!}\,.$$

При $P < 0{,}01$ нулевая гипотеза отвергается, а при $P \geq 0{,}05$ – принимается.

5. ОБЪЕДИНЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ НЕЗАВИСИМЫХ ОПРЕДЕЛЕНИЙ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

При необходимости объединения результатов *n* определений биологической активности одного и того же испытуемого препарата, применяют следующие способы.

Взвешенное среднее

Если при всех объединяемых биологических испытаниях исходят из одинакового значения ожидаемой активности испытуемого препарата, для каждого опыта рассчитывают весовой коэффициент:

$$W = \frac{4t^2}{L^2},$$

где L – разность логарифмов верхней и нижней доверительной границы биологической активности.

Средневзвешенная логарифмическая биологическая активность равна:

$$\overline{M} = \frac{\sum_n WM_U}{\sum_n W}$$

Среднее значение объединенной биологической активности = $10^{\overline{M}}$.

Стандартное отклонение средней биологической активности $s_{\overline{M}}$ обратно пропорционально сумме весовых коэффициентов объединяемых биологических испытаний:

$$s_{\overline{M}} = \sqrt{\frac{1}{\sum_n W}}.$$

Доверительные границы объединенной активности составляют $10^{\overline{M} \pm t \times s_{\overline{M}}}$, где $t = t(P, f)$, и при этом число степеней свободы f для данного значения критерия Стьюдента равно сумме степеней свободы показателей *«Отклонение»* объединяемых биологических испытаний (P = 95 %).

Однородность полученных результатов проверяют с помощью критерия Пирсона (P = 95 %):

$$\chi^2_{\text{набл.}} = \sum_n W\left(M_U - \overline{M}\right)^2,$$

$\chi^2_{\text{критич.}} = 0{,}1726 + 0{,}9569f + 2{,}7115\sqrt{f}$, где $f = n - 1$, $1 < f < 30$ и $P = 95$ %.

Критические значения критерия Пирсона можно также найти в приложении (табл. IV).

Наблюдаемое значение критерия Пирсона должно быть меньше критического[8].

Невзвешенное среднее

В случаях, когда расчет взвешенного среднего невозможен, например, при различном значении ожидаемой активности A_U в объединяемых опытах, используют невзвешенное среднее с доверительными границами, основанными на дисперсии между опытами [9].

$$\overline{M} = \frac{\sum_n M_U}{n},$$

$$s_{\overline{M}} = \sqrt{\frac{\sum_n \left(M_U\right)^2 - \left(\sum_n M_U\right)^2 \Big/ n}{n-1}}.$$

Доверительные границы равны $\overline{M} \pm ts_{\overline{M}}$ при $f = n - 1$ и $P = 95$ %.

[8] В противном случае при определенных условиях можно применять так называемое полувзвешенное среднее (см. руководство к соответствующей статистической компьютерной программе).
[9] Должно быть не менее 6 опытов.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Таблица I

Критические значения контрольного критерия *Q (P, n)*

n	*Q*		
	P = 90 %	*P* = 95 %	*P* = 99 %
3	0,89	0,94	0,99
4	0,68	0,77	0,89
5	0,56	0,64	0,76
6	0,48	0,56	0,70
7	0,43	0,51	0,64
8	040	0,48	0,58
9	0,38	0,46	0,55

Таблица II

Критические значения критерия Стьюдента

f	Доверительная вероятность			*f*	Доверительная вероятность		
	P = 95 %	*P* = 99 %	*P* = 99,9 %		*P* = 95 %	*P* = 99 %	*P* = 99,9 %
1	12,71	63,60		21	2,08	2,83	3,82
2	4,30	9,93	31,60	22	2,07	2,82	3,79
3	3,18	5,84	12,94	23	2,07	2,81	3,77
4	2,78	4,60	8,61	24	2,06	2,80	3,75
5	2,57	4,03	6,86	25	2,06	2,79	3,73
6	2,45	3,71	5,96	26	2,06	2,78	3,71
7	2,37	3,50	5,41	27	2,05	2,77	3,69
8	2,31	3,36	5,04	28	2,05	2,76	3,67
9	2,26	3,25	4,78	29	2,04	2,76	3,66
10	2,23	3,17	4,59	30	2,04	2,75	3,65
11	2,20	3,11	4,44	40	2,02	2,70	3,55
12	2,18	3,06	4,32	50	2,01	2,68	3,50
13	2,16	3,01	4,22	60	2,00	2,66	3,46
14	2,15	2,98	4,14	80	1,99	2,64	3,42
15	2,13	2,95	4,07	10	1,98	2,63	3,39
16	2,12	2,92	4,02	12	1,98	2,62	3,37
17	2,11	2,90	3,97	20	1,97	2,60	3,34
18	2,10	2,88	3,92	50	1,96	2,59	3,31
19	2,09	2,86	3,88	∞	1,96	2,58	3,29
20	2,09	2,85	3,85				
f	*p* = 0,05	*p* = 0,01	*p* = 0,001	*f*	*p* = 0,05	*p* = 0,01	*p* = 0,001
	Уровень значимости				Уровень значимости		

$t = 1{,}958788 + 2{,}429953/f + 2{,}189891/f^2 + 4{,}630189/f^3 + 1{,}398179/f^9$ при P = 95 %;

$t = 2{,}5638 + 5{,}49059/f + 2{,}72654/f^2 + 31{,}2446/f^3 + 21{,}6745/f^{10}$ при P = 99 %.

Таблица III

Критические значения критерия Фишера

f_2 – число степеней свободы для меньшей дисперси	f_1 – число степеней свободы для большей дисперсии									
	1	2	3	4	5	6	7	8	20	∞
3	**10,13** 34,12	**9,55** 30,81	**9,28** 29,46	**9,12** 28,71	**9,01** 28,24	**8,94** 27,91	**8,88** 27,67	**8,84** 27,49	**8,66** 26,69	**8,53** 26,12
6	**5,99** 13,74	**5,14** 10,92	**4,76** 9,78	**4,53** 9,15	**4,39** 8,75	**4,28** 8,47	**4,21** 8,26	**4,15** 8,10	**3,87** 7,39	**3,67** 6,88
9	**5,12** 10,56	**4,26** 8,02	**3,86** 6,99	**3,63** 6,42	**3,48** 6,06	**3,87** 5,80	**3,29** 5,62	**3,23** 5,47	**2,93** 4,80	**2,71** 4,31
12	**4,75** 9,33	**3,89** 6,93	**3,49** 5,95	**3,26** 5,41	**3,11** 5,06	**3,00** 4,82	**2,91** 4,64	**2,85** 4,50	**2,54** 3,86	**2,30** 3,36
15	**4,54** 8,68	**3,68** 6,36	**3,29** 5,42	**3,06** 4,89	**2,90** 4,56	**2,79** 4,32	**2,71** 4,14	**2,64** 4,00	**2,33** 3,37	**2,07** 2,87
20	**4,35** 8,10	**3,49** 5,85	**3,10** 4,94	**2,87** 4,43	**2,71** 4,10	**2,60** 3,87	**2,51** 3,70	**2,45** 3,56	**2,12** 2,94	**1,84** 2,42
30	**4,17** 7,56	**3,32** 5,39	**2,92** 4,51	**2,69** 4,02	**2,53** 3,70	**2,42** 3,47	**2,33** 3,30	**2,27** 3,17	**1,93** 2,55	**1,62** 2,01
60	**4,00** 7,08	**3,15** 4,98	**2,76** 4,13	**2,53** 3,65	**2,37** 3,34	**2,25** 3,12	**2,17** 2,95	**2,10** 2,82	**1,75** 2,20	**1,39** 1,60
∞	**3,84** 6,63	**3,00** 4,61	**2,60** 3,78	**2,37** 3,32	**2,21** 3,02	**2,10** 2,80	**2,01** 2,64	**1,94** 2,51	**1,57** 1,88	**1,00** 1,00

F для *P* = 95 % напечатаны жирным шрифтом, а *F* для *P* = 99 % – обычным.

Таблица IV

Критические значения критерия Пирсона (χ^2)

f	P = 95 %	P = 99 %	f	P = 95 %	P = 99 %	f	P = 95 %	P = 99 %
1	3,84	6,63	18	28,9	34,8	35	49,8	57,3
2	5,99	9,21	19	30,1	36,2	36	51,0	58,6
3	7,81	11,3	20	31,4	37,6	37	52,2	59,9
4	9,49	13,3	21	32,7	38,9	38	53,4	61,2
5	11,1	15,1	22	33,9	40,3	39	54,6	62,4
0	12,6	16,8	23	35,2	41,6	40	55,8	63,7
7	14,1	18,5	24	36,4	43,0	41	56,9	65,0
8	15,5	20,1	25	37,7	44,3	42	58,1	66,2
9	16,9	21,7	26	38,9	45,6	43	59,3	67,5
10	18,3	23,2	27	40,1	47,0	44	60,5	68,7
11	19,7	24,7	28	41,3	48,3	45	61,7	70,0
12	21,0	26,2	29	42,6	49,6	46	62,8	71,2
13	22,4	27,7	30	43,8	50,9	47	64,0	72,4
14	23,7	29,1	31	45,0	52,2	48	65,2	73,7
15	25,0	30,6	32	46,2	53,5	49	66,3	74,9
16	26,3	32,0	33	47,4	54,8	50	67,5	76,2
17	27,6	33,4	34	48,6	56,1			

$\chi^2 = 0{,}1726 + 0{,}9569f + 2{,}7115\sqrt{f}$ при $1 < f < 30$ и P = 95 %;

$\chi^2 = 1{,}9759 + 0{,}9521f + 3{,}7070\sqrt{f}$ при $1 < f < 30$ и P = 99 %.

Для f>30 справедливы следующие приближения:

$\chi^2 = \frac{1}{2}\left(\sqrt{2f-1} + 1{,}96\right)^2$ при P = 95 %;

$\chi^2 = \frac{1}{2}\left(\sqrt{2f-1} + 2{,}58\right)^2$ при P = 99 %.

Таблица V

Перевод процентов в пробиты

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	—	2,67	2,95	3,12	3,25	3,36	3,45	3,52	3,59	3,66
10	3,72	3,77	3,82	3,87	3,92	3,96	4,01	4,05	4,08	4,12
20	4,16	4,19	4,23	4,26	4,29	4,33	4,36	4,39	4,42	4,45
30	4,48	4,50	4,53	4,56	4,59	4,61	4,64	4,67	4,69	4,72
40	4,75	4,77	4,80	4,82	4,85	4,87	4,90	4,92	4,95	4,97
50	5,00	5,03	5,05	5,08	5,10	5,13	5,15	5,18	5,20	5,23
60	5,25	5,28	5,31	5,33	5,36	5,39	5,41	5,44	5,47	5,50
70	5,52	5,55	5,58	5,61	5,64	5,67	5,71	5,74	5,77	5,81
80	5,84	5,88	5,92	5,95	5,99	6,04	6,08	6,13	6,18	6,23
90	6,28	6,34	6,41	6,48	6,55	6,64	6,75	6,88	7,05	7,33
	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
99	7,33	7,37	7,41	7,46	7,51	7,58	7,65	7,75	7,88	8,09

Таблица VI

Перевод пробитов в весовые коэффициенты

Пробиты	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
3	1,0	1,2	1,4	1,6	1,8	2,0	2,3	2,6	2,9	3,2
4	3,5	3,7	3,9	4,1	4,3	4,5	4,6	4,7	4,8	4,9
5	5,0	4,9	4,8	4,7	4,6	4,5	4,3	4,1	3,9	3,7
6	3,5	3,2	2,9	2,6	2,3	2,0	1,8	1,6	1,4	1,2

Таблица VII

«Рабочие» пробиты для эффектов, равных 0 и 100 %

Число животных в группе (n)	0 %	100 %
2	3,85	6,15
3	3,62	6,38
4	3,47	6,53
5	3,36	6,64
6	3,27	6,73
7	3,20	6,80
8	3,13	6,87
9	3,09	6,91
10	3,04	6,96
11	3,00	7,00
12	2,97	7,03
13	2,93	7,07
14	2,90	7,10
15	2,87	7,13
16	2,85	7,15
17	2,82	7,18
18	2,80	7,20
19	2,78	7,22
20	2,76	7,24

Ситовой анализ	**ОФС.1.1.0015.15** **Взамен ГФ X** **Взамен ст. ГФ XI, вып.2**

Ситовой анализ – это определение фракционного состава или распределения по размерам частиц порошков и гранул просеиванием через сита. Ситовой анализ осуществляют просеиванием проб материала через набор стандартных сит, размер отверстий которых последовательно уменьшается сверху вниз, в результате чего материал разделяется на фракции.

Определение фракционного состава порошков и гранул используется в технологии лекарственных средств на различных стадиях производства.

Использование ситового анализа имеет ряд ограничений:

- для проведения анализа требуется, как правило, достаточно большое количество порошка (обычно – не менее 25 г);

- метод неприменим к несыпучим или забивающим отверстия сита порошкообразным материалам (маслянистым, липким, склонным к комкованию и др.);

- если исследуемые образцы гигроскопичны или, напротив, легко теряют влагу, при проведении анализа следует контролировать влажность и температуру окружающей среды;

- в случае анализа электризующихся веществ к образцу следует добавлять антистатик (кремния диоксид коллоидный, алюминия оксид и др.) в количестве до 0,5 % по массе.

Ситовой анализ может использоваться для предварительной характеристики измельченности порошка (табл. 1), а также для определения фракционного состава порошков или гранул.

Таблица 1 – Классификация порошков по измельченности

Измельченность порошка	**Размер отверстий (мкм) сит, через которые проходит анализируемый порошок**	
	не менее 95 %	**не более 40 %**
Очень крупный порошок	–	1400
Крупный порошок	1400	355
Среднемелкий порошок	355	180
Мелкий порошок	180	125
Очень мелкий порошок	125	90

Для получения более подробных данных о фракционном составе (распределении частиц по размерам) порошка или гранул помимо основных сит можно использовать дополнительные. Характеристики типовых размеров сит по международной классификации приведены в табл. 2. Допускается использовать наборы сит с другими размерами отверстий по ГОСТ. Содержание фракции выражают в виде массовой доли порошка, просеянного через соответствующие сита, в процентах. Если указан только один номер сита, это означает, что не менее 97 % порошка проходит через указанное сито.

Таблица 2 – Классификация типовых размеров сит

Номинальные размеры отверстий сит по международному стандарту ISO 3310-1			**US номер сита**	**Рекомендуемые USP сита, мкм**	**Европейский номер сита**	**Японский номер сита**
Основной размер R 20/3	**Дополнительные размеры R 20**	**R 40/3**				
11,20 мм	11,20 мм	11,20 мм			11200	
	10,00 мм					
		9,50 мм				
	9,00 мм					
8,00 мм	8,00 мм	8,00 мм				
	7,10 мм					
		6,70 мм				
	6,30 мм					
5,60 мм	5,60 мм	5,60 мм			5600	3.5
	5,00 мм					
		4,75 мм				4
	4,50 мм					
4,00 мм	4,00 мм	4,00 мм	5	4000	4000	4.7
	3,55 мм					
		3,35 мм	6			5.5
	3,15 мм					
2,80 мм	2,80 мм	2,80 мм	7	2800	2800	6.5

Номинальные размеры отверстий сит по международному стандарту ISO 3310-1			**US номер сита**	**Рекомендуемые USP сита, мкм**	**Европейский номер сита**	**Японский номер сита**
Основной размер R 20/3	**Дополнительные размеры R 20**	**R 40/3**				
	2,50 мм					
		2,36 мм	8			7.5
	2,24 мм					
2,00 мм	2,00 мм	2,00 мм	10	2000	2000	8.6
	1,80 мм					
		1,70мм	12			10
	1,60 мм					
1,40 мм	1,40 мм	1,40 мм	14	1400	1400	12
	1,25 мм					
		1,18 мм	16			14
	1,12 мм					
1,00 мм	1,00 мм	1,00 мм	18	1000	1000	16
	900 мкм					
		850 мкм	20			18
	800 мкм					
710 мкм	710 мкм	710 мкм	25	710	710	22
	630 мкм					
		600 мкм	30			26
	560 мкм					
500 мкм	500 мкм	500 мкм	35	500	500	30
	450 мкм					
		425 мкм	40			36
	400 мкм					
355 мкм	355 мкм	355 мкм	45	355	355	42
	315 мкм					
		300 мкм	50			50
	280 мкм					
250 мкм	250 мкм	250 мкм	60	250	250	60
	224 мкм					
		212 мкм	70			70
	200 мкм					
180 мкм	180 мкм	180 мкм	80	180	180	83
	160 мкм					
		150 мкм	100			100
	140 мкм					
125 мкм	125 мкм	125 мкм	120	125	125	119
	112 мкм					
		106 мкм	140			140
	100 мкм					
90 мкм	90 мкм	90 мкм	170	90	90	166
	80 мкм					
		75 мкм	200			200
	71 мкм					
63 мкм	63 мкм	63 мкм	230	63	63	235

Номинальные размеры отверстий сит по международному стандарту ISO 3310-1			**US номер сита**	**Рекомендуемые USP сита, мкм**	**Европейский номер сита**	**Японский номер сита**
Основной размер R 20/3	**Дополнительные размеры R 20**	**R 40/3**				
	56 мкм					
		53 мкм	270			282
	50 мкм					
45 мкм	45 мкм	45 мкм	325	45	45	330
	40 мкм					
		38 мкм			38	391

Для определения фракционного состава порошка собирают набор сит с размерами отверстий, покрывающими весь диапазон размеров частиц в образце.

Перед проведением анализа сита тщательно проверяют на наличие искривлений и трещин, особенно в местах крепления сетки к раме. Чистку сит рекомендуется проводить струей воздуха или пара. Если после этого некоторые отверстия остаются закупоренными, то допускается осторожно прочистить их с нижней стороны с помощью мягкой кисти или щетки. Регулярную калибровку сит проводят по действующему ISO. Для оценки среднего размера отверстий калибровку сит можно проводить оптическим методом. Кроме того, для оценки эффективного отверстия сит в интервале размеров 212-850 мкм возможно применение стандартных стеклянных сфер.

В зависимости от свойств исследуемого порошка и поставленных задач (технологических целей) ситовой анализ может выполняться следующими методами:

- механическое просеивание;
- воздухоструйное просеивание;
- звуковое просеивание.

Ситовой анализ с механическим просеиванием обычно применяют для анализа порошков или гранул, у которых не менее 80 % частиц имеют размер более 75 мкм. Для более мелких частиц, а также для частиц с выраженным свойством слипаться или прилипать к поверхности сита, более подходящим

является воздухоструйное или звуковое просеивание.

В воздухоструйном методе просеивание осуществляется потоком воздуха. Как правило, в данном методе используются более мелкие сита по сравнению с механическим просеиванием.

В методе звукового просеивания испытуемый образец вносится в вертикальную вибрирующую колонну воздуха, которая поднимает образец и переносит его обратно сквозь отверстия сита при заданной частоте вибраций.

Разные способы просеивания дают различные результаты ситового анализа, что необходимо учитывать при оценке результатов испытания.

Вне зависимости от выбранного метода предварительно определяют оптимальную массу пробы и время просеивания.

Выбор массы пробы

Если в фармакопейной статье или нормативной документации не указана масса испытуемой пробы, то испытание проводят для навесок порошка в интервале от 10 до 100 г. При выборе интервала навесок порошка учитывают его насыпную плотность и предварительно определенную измельченность (табл. 1). Так, например, если порошок определен как крупный, можно использовать навески от 25 до 100 г, при анализе мелких и очень мелких порошков – от 10 до 25 г, а в отдельных случаях – от 5 г и менее. В пределах выбранного интервала берут не менее 3 навесок. Если по результатам проведения испытания навеска порошка, например 100 г, имеет более низкий процент прохождения через самое мелкое из использованных сит, то предпочтение отдают интервалу от 25 до 50 г.

Выбор времени просеивания

Определяют массу каждого сита с точностью до 0,1 г. Точную навеску испытуемого порошка помещают на верхнее сито и закрывают крышкой. Проводят просеивание любым из методов в течение 5 мин, затем осторожно (без потерь вещества) снова взвешивают каждое сито и определяют массу вещества на каждом из сит. Таким же способом определяют массу вещества на поддоне. Снова собирают набор сит, встряхивают в течение 5 мин и взве-

шивают каждое сито, как описано выше. Эти процедуры повторяют до тех пор, пока изменение массы порошка на любом из сит не будет составлять менее 5 % (10 % – в случае сит 76 мм) или менее 0,1 г по сравнению с предыдущей массой вещества на этом сите.

Если на любом из сит масса вещества составляет менее 5 % от общей массы испытуемого образца, то изменение массы не должно превышать 20 % по сравнению с предыдущей массой на этом же сите. Если на любом из сит находится более 50 % от общей массы испытуемого образца, то при отсутствии других указаний, испытание повторяют, но в набор сит добавляют более грубое сито: между тем, которое несет избыточную массу, и предыдущим, более грубым ситом.

Сравнивают общие массы вещества до и после испытания. Общая потеря не должна превышать 5 % от первоначальной массы образца.

Повторяют испытание, используя общее время просеивания, равное сумме времен, определенных выше, чтобы убедиться, что общего времени хватает для достижения указанных выше изменений масс. Определенное таким образом время просеивания используют для последующих испытаний данного вещества.

Методика определения фракционного состава

Определяют массу каждого сита с точностью до 0,1 г. Точную навеску испытуемого вещества помещают на верхнее сито и закрывают крышкой. Проводят просеивание любым из методов в течение установленного времени, затем осторожно (без потерь вещества) снова взвешивают каждое сито и определяют массу вещества на каждом из сит. Таким же способом определяют массу вещества на поддоне.

При воздухоструйном просеивании испытания проводят на каждом из отдельных сит, начиная с самого мелкого, с единовременным использованием только одного сита.

Если оставшееся на любом из сит вещество состоит из агрегатов частиц, образовавшихся в процессе просеивания, анализ признается недействи-

тельным. В этом случае необходимо использовать другой метод определения размера частиц.

Представление результатов

Фракционный состав порошков и гранул и распределение частиц по размерам выражают в виде массовой доли порошка, просеянного через сита, в процентах. При этом следует указать массу испытуемого образца, время просеивания, метод испытания. При необходимости дополнительно указывают условия проведения испытания (влажность, температура, использование антистатиков, оборудование и др.).

Стерилизация **ОФС.1.1.0016.18**

Взамен ОФС.1.1.0016.15

В настоящей общей фармакопейной статье описаны методы и условия стерилизации, используемые при производстве/изготовлении стерильных лекарственных средств.

Стерилизация – это процесс освобождения объектов (лекарственных средств, вспомогательных веществ, оборудования, упаковки, воздушной среды и др.) от всех видов и форм жизнеспособных микроорганизмов. Стерилизация является обязательным технологическим этапом производства стерильных лекарственных средств, обеспечивающим их стерильность.

Под стерильностью понимают отсутствие всех видов и форм жизнеспособных микроорганизмов.

При производстве/изготовлении стерильных лекарственных средств допускается использование только валидированных методов стерилизации. При изменении условий стерилизации, в том числе при изменении объема загрузки стерилизатора, необходимо проводить повторную валидацию.

Выбор метода стерилизации должен проводиться с учетом таких показателей, как:

- чувствительность ЛС к действию стерилизующего агента;
- сохранение эффективности и безопасности ЛС;
- эффективность воздействия стерилизующего агента на микроорганизмы.

При производстве/изготовлении лекарственные средства подвергаются стерилизации в окончательной упаковке с использованием термических, химических или радиационных методов стерилизации.

В случаях, когда стерилизация в окончательной упаковке невозможна, используют метод стерилизующей фильтрации или производство в асептических условиях. Во всех случаях упаковка и укупорочные средства должны обеспечивать стерильность препарата в течение всего срока годности.

УРОВЕНЬ ОБЕСПЕЧЕНИЯ СТЕРИЛЬНОСТИ

Для методов, описанных ниже, в случае необходимости, указывают уровень обеспечения стерильности (УОС).

Уровень обеспечения стерильности процесса стерилизации – это степень гарантии, с которой процесс обеспечивает стерильность всех единиц продукции в серии. Для конкретного процесса уровень обеспечения стерильности определяется как вероятность наличия нестерильной единицы в серии. Например, УОС = 10^{-6} означает, что в подвергнутой стерилизации серии готового продукта объемом 10^{6} единиц существует вероятность наличия не более одной нестерильной единицы. Уровень обеспечения стерильности процесса стерилизации для конкретного продукта устанавливают в процессе валидации.

МЕТОДЫ И УСЛОВИЯ СТЕРИЛИЗАЦИИ

Стерилизация может быть проведена одним из следующих методов или их комбинацией.

1. Термические методы:

– насыщенным водяным паром под давлением (автоклавирование);

– горячим воздухом (воздушная стерилизация).

2. Химические методы:

– газами;

– растворами антисептиков.

3. Стерилизация фильтрованием (через фильтры с требуемым размером пор).
4. Радиационный метод стерилизации.

Использование модификации или комбинации этих методов допускается при условии проведения валидации выбранного процесса стерилизации, чтобы обеспечить как эффективность процесса, так и целостность продукта, упаковки и укупорочных средств.

Для всех методов стерилизации, в том числе при использовании стандартных условий, для подтверждения обеспечения необходимых условий стерилизации всей серии продукта, на протяжении всего процесса стерилизации проводят мониторинг на критических стадиях производства.

Термическая стерилизация

Стерилизация насыщенным паром под давлением (автоклавирование)

Стерилизацию насыщенным паром осуществляют при температуре 120 – 122 °С под давлением 120 кПа и при температуре 130 – 132 °С под давлением 200 кПа. Этот метод чаще всего применяют для водных растворов и других жидких лекарственных форм в герметично укупоренных, предварительно простерилизованных флаконах, ампулах или других видах упаковки. Стерилизацию проводят в паровых стерилизаторах (автоклавах). Стандартными условиями являются нагревание при температуре 120 – 122 °С в течение 15 мин.

Время стерилизации зависит от физико-химических свойств и объема продукта (табл. 1).

Таблица 1 – Время стерилизации для различного объема раствора

Объем продукта, мл	**Минимальное время стерилизации, мин**
до 100	8
от 100 до 500	12
от 500 до 1000	15

Жиры и масла стерилизуют при температуре 120 – 122 °С в течение 2 ч. Изделия из стекла, фарфора, металла, перевязочные и вспомогательные материалы стерилизуют при температуре 120 – 122 °С – в течение 45 мин, при 130 – 132 °С – в течение 20 мин.

Допускаются другие сочетания времени и температуры при условии валидации процесса стерилизации для достижении УОС не более 10^{-6}.

Автоклав загружают так, чтобы обеспечить однородность температуры в пределах всей загрузки. В ходе автоклавирования следует регистрировать условия процесса стерилизации (температуру, давление и время). Температуру, как правило, измеряют с помощью термочувствительных элементов, помещенных в контрольные упаковки, вместе с дополнительными термоэлементами, помещенными в самые низкотемпературные места стерилизационной камеры, которые устанавливаются заранее. Условия каждого цикла стерилизации регистрируются, например, в виде температурно-временной диаграммы или другим подходящим способом.

Для оценки эффективности каждого цикла стерилизации используют химические (термовременные) индикаторы. Бактериологический контроль работы стерилизаторов проводят после монтажа и ремонта оборудования, а также в процессе его эксплуатации (плановый - 2 раза в год и при получении неудовлетворительных результатов контроля).

Стерилизация горячим воздухом (воздушная стерилизация)

Для этого метода термической стерилизации стандартными условиями являются нагревание при температуре не менее 160 °С в течение не менее 2 ч.

Для стерилизации термостойких порошкообразных веществ (натрия хлорида, цинка оксида, талька, белой глины и др.) или минеральных и растительных масел, жиров, ланолина, вазелина, воска и др. температуру и время стерилизации устанавливают в зависимости от массы образца (табл. 2 и 3).

Таблица 2 – Условия стерилизации для термостойких порошкообразных веществ

Масса образца, г	**Температура, °С**	**Минимальное время стерилизации, мин**
до 25	180	30
	200	10
от 25 до100	180	40
	200	20
от 100 до 200	180	60
	200	30

Таблица 3 – Условия стерилизации для минеральных и растительных масел, жиров, ланолина, вазелина, воска и др.

Масса образца, г	**Температура, °С**	**Минимальное время стерилизации, мин**
до 100	180	30
	200	15
от 100 до 500	180	40
	200	20

Изделия из стекла, металла, фарфора, установки для стерилизующего фильтрования с фильтрами и приемники фильтрата стерилизуют при температуре 180 °С в течение 60 мин, или при температуре 160 °С – в течение 2,5 ч.

Воздушную стерилизацию при температуре более 220 °С обычно применяют для стерилизации и депирогенизации стеклянной упаковки. В этом случае должно быть доказано уменьшение на 3 порядка количества термостойких эндотоксинов вместо использования биологических индикаторов.

Допускается использование сочетаний времени и температуры, если предварительно доказано, что выбранный режим стерилизации обеспечивает

необходимый и воспроизводимый уровень гибели микроорганизмов. Используемые процедуры должны обеспечивать УОС не более 10^{-6} .

Воздушную стерилизацию проводят в специальном сухожаровом шкафу с принудительной циркуляцией стерильного воздуха или на другом оборудовании, специально предназначенном для этих целей. Стерилизационный шкаф загружают таким образом, чтобы обеспечить однородность температуры в пределах всей загрузки. Температуру в стерилизационном шкафу, как правило, измеряют с помощью термочувствительных элементов, помещенных в контрольные упаковки, вместе с дополнительными термоэлементами, помещенными в самые низкотемпературные места стерилизационного шкафа, которые устанавливаются заранее. В ходе каждого цикла стерилизации регистрируют температуру и время.

Для оценки эффективности каждого цикла стерилизации используют химические (термовременные) индикаторы. Бактериологический контроль работы стерилизаторов проводят после монтажа и ремонта оборудования, а также в процессе его эксплуатации (плановый - 2 раза в год и при получении неудовлетворительных результатов контроля).

Химическая стерилизация

Химическую стерилизацию проводят газом или растворами.

Газовая стерилизация

Стерилизация газом применяется только в случае, если не могут быть использованы другие методы. При этом способе стерилизации должно быть обеспечено проникновение газа и влаги в стерилизуемый продукт, а также последующая дегазация и удаление продуктов его разложения в стерилизуемом продукте до уровня, не вызывающего токсического эффекта при применении лекарственного средства.

Стерилизацию газом проводят в газовых стерилизаторах или микроанаэростатах (портативный аппарат), оборудованных системой подачи

газа и постстерилизационной дегазации. В качестве газа обычно используют оксид этилена. В связи с его высокой пожароопасностью, допускается его смешивание с каким-либо инертным газом.

Стерилизацию газом проводят при следующих режимах:

– оксид этилена: стерилизующая доза 1200 мг/дм^3, температура не менее 18°С, относительная влажность 80 %, время выдержки – 16 ч (портативный аппарат);
– смесь оксида этилена и бромистого метила (1:2,5):

а) стерилизующая доза 2000 мг/дм^3, температура 55 °С, относительная влажность 80 %, время выдержки 4 ч;

б) стерилизующая доза 2000 мг/дм^3, температура не менее 18 °С, относительная влажность 80 %, время выдержки 16 ч.

Допускается использование других валидированных режимов газовой стерилизации, обеспечивающих стерильность и сохранность объекта.

Оксид этилена может проявлять мутагенные свойства и токсичность, особенно при использовании материалов, содержащих ионы хлора. В связи с токсичностью оксида этилена и бромистого метила применение стерилизованных этими газами изделий допускается только после их дегазации, т. е. выдержки в вентилируемом помещении до допустимых остаточных количеств, указанных в нормативной документации.

Условия дегазации зависят от назначения, способа применения, размеров изделий, материала изделия и упаковки и указываются в нормативно-технической документации на изделие.

По возможности в процессе стерилизации регистрируют следующие показатели: концентрацию газа, относительную влажность, температуру и время стерилизации. Измерения проводят в тех зонах, где условия стерилизации достигаются хуже всего, что устанавливают в процессе валидации.

Стерилизуемые изделия упаковывают в пакеты из полиэтиленовой пленки толщиной от 0,06 до 0,20 мм, пергамента и др. Метод рекомендован для изделий из резины, полимерных материалов, стекла, металла.

Эффективность процесса газовой стерилизации проверяют при каждой загрузке с помощью биологических индикаторов.

Химическая стерилизация растворами

Химическую стерилизацию проводят растворами антисептиков (водорода пероксид и надкислоты). Эффективность стерилизации изделий растворами антисептиков зависит от концентрации активно действующего вещества, времени стерилизации и температуры стерилизующего раствора.

При стерилизации 6 % раствором водорода пероксида температура стерилизующего раствора должна быть не менее 18 °С, время стерилизации – 6 ч; при температуре 50 °С – 3 ч.

При стерилизации 1 % раствором дезоксона-1 (по надуксусной кислоте) температура стерилизующего раствора должна быть не менее 18 °С, время стерилизации 45 мин.

Химическую стерилизацию растворами антисептиков проводят в закрытых емкостях из стекла, пластмассы или емкостях, покрытых неповрежденной эмалью, при полном погружении изделия в раствор на время стерилизации. После этого изделие промывают стерильной водой в асептических условиях.

Метод стерилизации растворами антисептиков применяют для изделий из полимерных материалов, резины, стекла, коррозийно-стойких металлов.

Стерилизация фильтрованием (стерилизующая фильтрация)

Стерильность некоторых лекарственных препаратов, которые не могут быть подвергнуты финишной стерилизации в первичной упаковке ни одним из описанных выше методов, может быть достигнута на завершающих этапах производства фильтрованием приготовленного раствора с использованием мембранных фильтров с номинальным размером пор не более 0,22 мкм,

способных удалять большинство бактерий и плесневых грибов. Как правило, такие лекарственные препараты содержат фармацевтические субстанции, которые не могут быть подвержены термической стерилизации ввиду особенностей их строения и физико-химических свойств. В связи с тем, что при стерилизующей фильтрации по сравнению с другими процессами стерилизации существует потенциальный дополнительный риск, непосредственно перед фасовкой рекомендуется повторная фильтрация через дополнительный стерилизующий фильтр, задерживающий микроорганизмы. Последнюю стерилизующую фильтрацию необходимо осуществлять как можно ближе к месту фасовки. Операции, следующие за фильтрацией, проводят в асептических условиях. В зависимости от свойств фармацевтической субстанции и уровня микробной контаминации приготовленного раствора лекарственного препарата допускается однократная стерилизация фильтрованием непосредственно перед розливом, что должно быть подтверждено валидацией процесса. Уровень микробной контаминации перед фильтрованием определяют для каждой серии продукции. Параметры процесса должны соответствовать параметрам, установленным в ходе валидации процесса фильтрации.

Эффективность стерилизующей фильтрации зависит от размера пор фильтра, уровня микробной контаминации (бионагрузки) перед началом фильтрации и адсорбции микроорганизмов на фильтре.

В случаях, когда для снижения бионагрузки требуется предварительная фильтрация, ее осуществляют через мембранные фильтры с размером пор не более 0,45 мкм. Для стерилизующей фильтрации растворы пропускают через мембранные фильтры с номинальным размером пор не более 0,22 мкм, способные задерживать не менее 10^7 микроорганизмов *Pseudomonas diminuta / Brevundimonas diminuta* на квадратный сантиметр поверхности. Допускается использование других типов фильтров, обеспечивающих такую же эффективность фильтрации.

Пригодность мембранных фильтров устанавливают путем микробиологических испытаний с использованием соответствующих микроорганизмов, например, *Pseudomonas diminuta / Brevundimonas diminuta* (ATCC 19146, NCIMB 11091 или CIP 103020). Рекомендуется использовать не менее 10^7 КОЕ/см^2 активной поверхности фильтра.

Уровень фильтрации определяют как величину логарифма снижения (ВЛС) микробной загрязненности. Например, если при фильтрации через мембранный фильтр с размером пор 0,22 мкм задерживается 10^7 микроорганизмов, ВЛС составляет не менее 7.

Следует учитывать уровень микробной контаминации, (бионагрузки) до начала фильтрации, пропускную способность фильтра, объем серии продукта, продолжительность фильтрации, а также избегать загрязнений продукта микроорганизмами с фильтра. Срок использования фильтра не должен превышать времени, установленного при валидации данного фильтра в сочетании с конкретным фильтруемым продуктом. Не следует повторно использовать мембранные фильтры.

Производственный процесс и производственная среда должны обеспечивать минимальный риск микробного загрязнения и требуют регулярного мониторинга.

Лекарственные препараты, которые в силу особенностей своего строения и физико-химических свойств не могут быть подвергнуты никакому из видов стерилизации, производятся/изготавливаются в асептических условиях без последующей стерилизации.

Получение лекарственных препаратов в асептических условиях

Целью получения лекарственных препаратов в асептических условиях без последующей стерилизации конечного продукта является сохранение стерильности препарата с использованием компонентов, каждый из которых был предварительно простерилизован одним из вышеописанных методов. Это достигается путем проведения процесса в помещениях определенного

класса чистоты, а также использования условий и оборудования, обеспечивающих стерильность.

В асептических условиях могут осуществляться: процесс наполнения упаковки, укупорка, асептическое смешивание ингредиентов с последующим асептическим наполнением и укупоркой. Для сохранения стерильности ингредиентов и готового продукта в ходе производственного процесса особое внимание следует уделять:

– состоянию производственной среды;
– персоналу;
– критическим поверхностям;
– стерилизации упаковки и укупорочных средств и передаточным процедурам;
– предельно допустимому времени хранения продукта до момента наполнения конечной упаковки.

Валидация процесса включает надлежащую проверку всех перечисленного выше пунктов, а также систематический контроль с применением имитационных тестов с использованием питательной среды, которую инкубируют и исследуют на наличие микробной контаминации (тесты на заполнение питательными средами, что соответствует моделированию асептического процесса). Перед выпуском каждой серии продукта, простерилизованного фильтрованием и/или изготовленного в асептических условиях, следует проводить испытания стерильности на соответствующем количестве образцов.

Радиационный метод стерилизации

Радиационный метод стерилизации осуществляют путем облучения продукта ионизирующим излучением. Данный метод может быть использован для стерилизации лекарственного растительного сырья, лекарственных растительных препаратов, лекарственных средств растительного происхождения и др.

γ-излучение, источником которого может быть либо радиоизотопный элемент (например, кобальт-60), либо пучок электронов, подаваемый соответствующим ускорителем электронов.

Для этого метода стерилизации дозу поглощения устанавливают от 10 до 50 кГр. Допускается использование других доз, если предварительно доказано, что выбранный режим обеспечивает необходимый и воспроизводимый уровень летальности микроорганизмов. Используемые процедуры и меры предосторожности должны обеспечивать уровень обеспечения стерильности не более 10^{-6}.

Преимуществом радиационной стерилизации является ее низкая химическая активность и легко контролируемая доза излучения, которая может быть точно измерена. Радиационная стерилизация проходит при минимальной температуре, однако могут быть ограничения при использовании некоторых типов стеклянной и пластиковой упаковки.

В процессе радиационной стерилизации следует постоянно осуществлять мониторинг поглощенного готовым продуктом излучения при помощи установленных дозиметрических методов независимо от величины дозы. Дозиметры калибруют по отношению к стандартному источнику на эталонной радиационной установке при получении от поставщика и затем с периодичностью, не превышающей одного года.

Если предусмотрена биологическая оценка, ее проводят с использованием биологических индикаторов.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ИНДИКАТОРЫ СТЕРИЛИЗАЦИИ

Биологические индикаторы – это стандартизованные препараты определенных микроорганизмов, используемые для оценки эффективности процесса стерилизации.

Биологический индикатор обычно представляет собой споры бактерий, нанесенные на инертный носитель, например, полоску фильтровальной бумаги, стеклянную пластинку или пластиковую пробирку. Инокулированный носитель изолируют так, чтобы предотвратить его

повреждение или загрязнение и, в то же время, обеспечить контакт стерилизующего агента с микроорганизмами. Суспензии спор могут находиться в герметично запаянных ампулах.

Биологические индикаторы готовят таким образом, чтобы обеспечить их сохранность при определенных условиях; для них должен быть указан срок годности.

Те же штаммы бактерий, что используют при производстве биологических индикаторов, могут быть инокулированы непосредственно в жидкий продукт, подлежащий стерилизации, или в жидкий продукт, аналогичный стерилизуемому. В этом случае должно быть доказано, что жидкий продукт не оказывает ингибирующего действия на споры, особенно на их прорастание.

Для биологического индикатора указывают следующие характеристики: вид бактерий, используемых в качестве эталонных микроорганизмов; номер штамма в исходной коллекции; число жизнеспособных спор, приходящееся на носитель; величину *D*.

Величина *D* – значение параметра стерилизации (продолжительность или поглощенная доза), обеспечивающее снижение числа жизнеспособных микроорганизмов до 10 % от их исходного числа. Эта величина имеет смысл для строго определенных экспериментальных условий стерилизации. Биологический индикатор должен содержать только указанные микроорганизмы. Допускается использование биологических индикаторов, содержащих более одного вида бактерий на одном носителе. Должна быть указана информация о питательной среде и условиях инкубации.

Рекомендуется размещать индикаторы в областях, наименее доступных для стерилизующего агента, определенных предварительно эмпирически или на основании предварительных физических измерений. После воздействия стерилизующего агента носитель спор переносят на питательную среду в асептических условиях.

Допускается использование биологических индикаторов промышленного производства в закрытых ампулах с питательной средой, помещенных непосредственно в упаковку, защищающую инокулированный носитель.

Выбор эталонных микроорганизмов для биологических индикаторов осуществляют с учетом следующих требований:

– устойчивость тест-штамма к конкретному методу стерилизации должна быть выше по сравнению с устойчивостью всех патогенных микроорганизмов и других микроорганизмов, контаминирующих продукт;

– тест-штамм должен быть непатогенным;

– тест-штамм должен легко культивироваться.

Если после инкубации наблюдается рост эталонных микроорганизмов, это свидетельствует о неудовлетворительно проведенном процессе стерилизации.

Особенности применения биологических индикаторов стерилизации

Стерилизация насыщенным паром под давлением. Биологические индикаторы для контроля стерилизации насыщенным паром под давлением рекомендуется использовать при валидации циклов стерилизации. Рекомендуется использовать *Bacillus stearothermophilus* (например, ATCC 7953, NCTC 10007, NCIMB 8157 или CIP 52.81). Число жизнеспособных спор должно превышать $5 \cdot 10^5$ на носитель. Величина *D* при температуре 121 °C должна составлять более 1,5 мин. При обработке биологического индикатора паром при температуре (121 ± 1) °C под давлением 120 кПа в течение 6 мин должно наблюдаться сохранение жизнеспособных спор, а обработка при той же температуре в течение 15 мин должна приводить к полной гибели эталонных микроорганизмов.

Воздушная стерилизация. Рекомендуется использовать для приготовления биологических индикаторов *Bacillus subtilis* (например, *var. niger* ATCC 9372, NCIMB 8058 или CIP 77.18). Число жизнеспособных спор должно превышать $1 \cdot 10^5$ на носитель, величина *D* при температуре 160 °C составляет 1 – 3 мин. Для стерилизации и депирогенизации стеклянного оборудования часто используют горячий воздух при температуре более 220 °C. В этом случае заменой биологическим индикаторам может служить снижение на 3 порядка количества термостойких бактериальных эндотоксинов.

Радиационная стерилизация. Биологические индикаторы могут использоваться для мониторинга текущих операций в качестве дополнительной оценки эффективности установленной дозы излучения, особенно в случае стерилизации ускоренными электронами. Рекомендуются споры *Bacillus pumilus* (например, ATCC 27.142, NCTC 10327, NCIMB 10692 или CIP 77.25). Число жизнеспособных спор должно превышать $1 \cdot 10^7$ на носитель. Величина *D* должна составлять более 1,9 кГр. Следует убедиться, что после облучения биологического индикатора дозой 25 кГр (минимальная поглощенная доза) рост эталонных микроорганизмов не наблюдается.

Газовая стерилизация. Использование биологических индикаторов необходимо при проведении всех процедур газовой стерилизации как при валидации циклов, так и при проведении рутинных операций. Рекомендуется использовать споры *Bacillus subtilis* (например, *var. niger* ATCC 9372, NCIMB 8058 или CIP 77.18) при использовании этилена оксида. Число жизнеспособных спор должно превышать $5 \cdot 10^5$ на носитель. Параметры устойчивости следующие: величина *D* составляет более 2,5 мин для испытания цикла при концентрации этилена оксида 600 мг/л, температуре 54 °C и 60 % относительной влажности. Следует убедиться, что после 60-минутного цикла стерилизации с указанными параметрами не наблюдается рост эталонных микроорганизмов, тогда как после 15 мин цикла

стерилизации при более низкой температуре (600 мг/л, 30 °С, 60 % влажности) жизнеспособность спор сохраняется.

Биологический индикатор должен позволять обнаруживать недостаточную влажность в стерилизаторе и продукте: при воздействии на него этилена оксида концентрации 600 мг/л при температуре 54 °С в течение 60 мин без увлажнения должна сохраняться жизнеспособность спор.

Полиморфизм	**ОФС.1.1.0017.15** **Вводится впервые**

Полиморфизм – способность вещества существовать в различных кристаллических формах при одинаковом химическом составе. Такие формы называются полиморфными модификациями.

Оценка полиморфизма фармацевтической субстанции обязательна в тех случаях, когда полиморфная модификация определяет терапевтическую эффективность и безопасность лекарственного препарата.

В основе структурной классификации типов полиморфизма лежат как параметры кристаллической решетки, так и внутренние геометрические параметры – углы вращения, валентные углы и связи, определяющие конформацию молекулы (конформационный полиморфизм).

Полиморфные модификации являются термодинамическими фазами и устойчивы в определённом интервале температур, давлений или других внешних условий, например, воздействующего электрического или магнитного полей. Переход одной модификации в другую происходит при определённой температуре, сопровождается тепловым эффектом и скачкообразным изменением свойств.

Скорость полиморфного превращения определяется величиной преодолеваемого энергетического барьера и зависит от числа и характера связей, разрывающихся при переходе одной кристаллической структуры в другую.

С точки зрения термодинамики различают монотропные и энантиотропные полиморфные превращения (переходы). Энантиотропные (обратимые) превращения характеризуются обратимостью перехода

полиморфных модификаций из одной в другую, т.е. в результате нагревания низкотемпературная модификация переходит в высокотемпературную, которая при определённых температурах и давлении может существовать в метастабильном состоянии или переходить в низкотемпературную модификацию. Монотропные (необратимые) переходы при любых температурах возможны лишь в одном направлении – от метастабильной к более термодинамически выгодной, стабильной модификации.

Монотропные полиморфные превращения часто наблюдаются у лекарственных веществ, которые могут иметь несколько метастабильных модификаций. Различие между температурами плавления модификаций является критерием их стабильности: чем оно меньше, тем более стабильна полиморфная модификация.

Полиморфные модификации проявляют различные физические и физико-химические свойства, такие как температура плавления, размер кристаллов, плотность, растворимость и скорость растворения, удельная теплоёмкость, электропроводность, угол смачивания, показатель преломления, коэффициент рассеяния света, ИК-спектры, КР-спектры, термограммы, рентгеновские дифрактограммы. Химические свойства полиморфных модификаций одинаковы в жидкой фазе (растворах или в расплавах).

Различные полиморфные модификации одной и той же фармацевтической субстанции могут проявлять различную фармакологическую активность, что должно быть учтено при разработке технологии получения лекарственного препарата.

Для новых фармацевтических субстанций необходимо зафиксировать то кристаллическое состояние, при котором наблюдалась соответствующая эффективность и токсичность при доклиническом изучении.

Свойства полиморфных модификаций действующего вещества проявляются в лекарственных формах с твердой дисперсной фазой: в

суспензиях, гранулах, таблетках, капсулах и др., что необходимо контролировать соответствующими методами.

Конформационный (молекулярный) полиморфизм может оказывать влияние на сохранение разных свойств полиморфной модификации не только в твердом состоянии, но и в коллоидных растворах (термодинамически неравновесных, кинетически заторможенных).

В отличие от полиморфизма, сольватоморфизм (псевдополиморфизм) обусловлен сольватацией. Сольваты – молекулярные комплексы, которые в кристаллической решётке содержат молекулы растворителя при определённом стехиометрическом соотношении вещества и растворителя. Частный случай сольватов – гидраты (если растворителем является вода).

Физико-химические свойства кристаллических сольватов должны учитываться при разработке процессов грануляции, сушки, прессования, измельчения, таблетирования и др. Сольваты фармацевтических субстанций и их несольватированные формы обладают различной растворимостью, скоростью растворения и биодоступностью.

Для получения полиморфных модификаций и кристаллических сольватов применяют методы равновесной и неравновесной кристаллизации при варьировании условий кристаллизации (скорость кристаллизации, температура, тип растворителя, концентрация раствора и др.), а также метод осаждения и различные методы сушки.

Для обнаружения и исследования полиморфных модификаций фармацевтических субстанций используют различные методы, среди которых основными являются следующие.

I. Дифракция рентгеновских лучей:

1. Рентгеноструктурный анализ;

2. Метод порошкового рентгеноструктурного анализа.

II. Спектральные методы:

1. Спектрометрия в инфракрасной области;

2. Рамановская спектрометрия;

3. Твердофазная спектроскопия ядерного магнитного резонанса.

III. Термоаналитические методы:

1. Термогравиметрия;

2. Дифференциальная сканирующая калориметрия;

3. Термомикроскопия.

IV. Оптическая и сканирующая электронная микроскопия (в том числе поляризационная).

V. Растворимость и скорость растворения.

VI. Биологические методы.

Часто используют комплекс различных методов исследования.

В ряде случаев трудно доказать, что лекарственный препарат содержит действующее вещество необходимой полиморфной формы, так как при экстракции образца для анализа оно может изменить свою кристаллическую форму. Если известно, что действующее вещество присутствует в полиморфной модификации, тогда тест «Растворение» может быть выбран как способ подтверждения полиморфизма в лекарственном препарате.

Диаграммы давление – температура и энергия – температура, основанные на экспериментальных данных, характеризуют стабильность полиморфных модификаций. Для изучения сольватов предпочтительно использовать термогравиметрию в комбинации с определением растворимости, скорости растворения и Рамановской спектрометрией. При изучении гидратов определяют изотермы сорбции-десорбции воды для характеристики зон относительной стабильности.

Кристалличность **ОФС.1.1.0018.15**

Вводится впервые

Степень кристалличности фармацевтической субстанции является одним из важных ее показателей, от которой зависит качество лекарственных препаратов. Одна и та же субстанция может находиться в кристаллическом или аморфном состоянии или представлять смесь кристаллической и аморфной форм.

Степень кристалличности – это отношение массы кристаллической части порошка испытуемой субстанции к ее общей массе, выраженное в процентах или долях.

Кристаллическое состояние – это устойчивое фазовое состояние твердого вещества, структура которого обладает пространственной трехмерной периодичностью в расположении молекул. Строгая трехмерная повторяемость в расположении молекул, распространяющаяся на бесконечное число периодов, называется кристаллической решеткой. Твердые кристаллические вещества, имеющие кристаллическую решетку без пространственных дефектов, обладают 100 % кристалличностью. Вследствие своей максимальной упорядоченности кристаллическое состояние вещества характеризуется минимальной внутренней энергией и является термодинамически равновесным состоянием при данных параметрах (давлении, температуре). На фазовой диаграмме однокомпонентных систем, которая строится в координатах давление – температура, кристаллы занимают определенную область, соответствующую более низким температурам и более высоким давлениям. Одна из самых характерных особенностей кристаллического состояния – *анизотропия* физических и

физико-химических свойств, заключающаяся в том, что свойства кристаллов различаются в зависимости от направления. Кристаллические вещества имеют постоянную температуру плавления.

Все реальные кристаллы обладают некоторыми дефектами кристаллической решетки, которые повышают как энтальпию, так и энтропию кристаллической решетки.

Если кристаллическая решётка содержит максимально возможную плотность пространственных дефектов различных порядков, вещество является аморфным. Полностью аморфные вещества соответствуют нулевой кристалличности. Аморфные вещества характеризуются беспорядочным расположением молекул, не имеют постоянной температуры плавления и обладают лишь ближним порядком в расположении молекул и *изотропией* формы и других физических свойств, т.е. их независимостью от направления. Аморфное состояние не является термодинамически устойчивым состоянием. Чем меньше степень кристалличности вещества, тем, соответственно, выше степень его аморфности, больше его растворимость, скорость растворения и реакционная способность, но тем меньше его стабильность. Эти важные свойства оказывают влияние на стабильность, биодоступность и технологические характеристики лекарственных средств.

Иногда аморфные субстанции, благодаря своей более высокой биодоступности, предпочтительнее для разработки лекарственной формы и лекарственного препарата. Однако, из-за своего метастабильного состояния, некоторые аморфные субстанции трудно использовать, так как они переходят в стабильное кристаллическое состояние.

Порошок субстанции может содержать не только частицы с различной степенью кристалличности, но и иметь частицы разной формы и размера. Чем меньше кристалличность частицы, тем больше ее энтальпия и энтропия.

При производстве лекарственных препаратов в фармакопейной статье или нормативной документации необходимо указывать степень кристалличности, размер частиц субстанции.

Для измерения степени кристалличности используют следующие методы.

1. Дифференциальная сканирующая калориметрия позволяет определить тепловой эффект растворения, который при постоянном атмосферном давлении соответствует изменению энтальпии и характеризует степень кристалличности вещества. Энтальпия растворения пропорциональна количеству растворенного вещества.

2. Оптическая микроскопия в поляризованном свете. Для определения состояния вещества (кристаллическое или аморфное) несколько частиц испытуемого вещества помещают на чистое предметное стекло в каплю минерального масла и исследуют с помощью поляризационного микроскопа. Кристаллические частицы обладают двойным лучепреломлением и свойством изменять направление оптических плоскостей при вращении столика микроскопа, что приводит к периодическому сверканию.

3. Рентгенодифракционный анализ порошков. Дифрактограммы позволяют оценить форму и размеры кристаллитов (0,005 – 0,0005 мм), а также соотношение кристаллической и аморфной фаз.

4. Ближняя инфракрасная спектрофотометрия, диапазон которой состоит из двух областей: коротковолновая область 750 – 1100 нм и длинноволновая – 1100 – 2500 нм.

5. Сканирование с помощью электронной микроскопии.

6. Ультразвуковая дифракция.

Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов	**ОФС.1.1.0019.15**
	Взамен ст. ГФ XI, вып.2

Настоящая общая фармакопейная статья устанавливает требования к упаковке, маркировке и транспортированию лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов.

Упаковка лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов

Упаковка должна обеспечивать защиту лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов в процессе хранения и транспортирования от повреждений, потерь, отрицательного действия факторов окружающей среды (температура, влажность, свет), а также сохранность и неизменность свойств лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов в течение установленного срока его годности.

Упаковка должна быть изготовлена в соответствии с действующими в РФ требованиями к данному виду упаковки из материалов, разрешенных к применению в РФ.

Упаковка должна быть однородной по типу для каждой партии сырья; чистой, сухой, без посторонних запахов. Материалы, из которых изготавливается упаковка, должны быть прочными, легкими, химически и физически индифферентными при контакте с лекарственным растительным сырьем/препаратом.

Для высушенного лекарственного растительного сырья используют

следующие виды упаковки:

1) Мешки тканевые, мешки из химических волокон и мешки льно-джуто-кенафные. При упаковывании сырья в двойные мешки предварительно один мешок вкладывают в другой.

Масса сырья, упакованного в мешок, должна быть не более 40 кг.

2) Мешки бумажные многослойные, пакеты бумажные двойные или одинарные.

Масса сырья, упакованного в бумажный многослойный мешок, должна быть не более 25 кг, в одинарный или двойной пакет – не более 5 кг.

3) Полиэтиленовые мешки.

Масса сырья, упакованного в полиэтиленовый мешок, должна быть не более 15 кг.

Мешки используют для упаковки плодов, семян, измельченных коры, корней и корневищ. В двойные мешки упаковывают тяжеловесное, гигроскопичное и сыпучее сырье (цветки полыни, корни алтея, соплодия ольхи, сырье в виде порошка, сборы).

4) Тюки продолговатой формы, изготовленные из тканей.

5) Тюки, имеющие форму ящика, – это тюки специального пошива, имеющие форму шестигранника, сшитые из одного или нескольких кусков упаковочной ткани специального кроя.

Масса сырья, упакованного в тюки, должна быть не более 50 кг.

В тюки обычно упаковывают лекарственное растительное сырье, которое не может подвергаться прессованию (например, листья толокнянки, трава чабреца, соплодия ольхи и др.).

6) Кипы, обшитые тканью, получают прессованием сырья и обтягиванием кипы тканью.

Кипы, не обшитые тканью*, получают прессованием сырья и обтягиванием кипы поперек в 4 местах стальной упаковочной лентой.

***Примечание** – Применение данной упаковки допускается для несыпучего сырья, не изменяющего свойств под действием солнечных лучей (кора и корни).

Масса сырья, упакованного в кипы, должна быть не более 200 кг.

Кипы используют для упаковки коры, корней, корневищ, листьев и трав.

7) Ящики из гофрированного картона и листовых древесных материалов.

Масса сырья, упакованного в ящики из гофрированного картона, должна быть не более 25 кг, в ящики из листовых древесных материалов – не более 30 кг.

В ящики упаковывают хрупкие и сыпучие виды лекарственного растительного сырья.

8) Мягкие контейнеры.

Для упаковки лекарственных растительных препаратов (фасованной продукции) используют пачки картонные с внутренним пакетом, пакеты бумажные, фильтр-пакеты бумажные и др.

Лекарственные растительные средства, требующие защиты от света, должны храниться в защищенном от света месте и/или в светозащитной упаковке.

Светозащитная упаковка – упаковка, которая защищает содержимое от действия световой энергии за счет материала упаковки.

Светозащитная упаковка может быть как первичной, так и вторичной (потребительской). В отдельных случаях может быть использована или первичная или вторичная светозащитная упаковка.

Для лекарственных растительных препаратов может использоваться вторичная светозащитная упаковка из картона, плотность которого не менее 230 г/м^2.

Для упаковки лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов могут быть использованы другие виды упаковки, соответствующие требованиям настоящей ОФС.

Виды упаковки и масса лекарственного растительного сырья, упакованного в тару, устанавливаются нормативной документацией на конкретные виды лекарственного растительного сырья.

Маркировка лекарственного растительного сырья

Каждая упаковочная единица с лекарственным растительным сырьем должна быть промаркирована путем нанесения информации непосредственно на упаковку несмывающейся краской либо путем прикрепления этикетки (маркировочного ярлыка). Наносимая информация должна соответствовать требованиям действующего законодательства РФ.

Если наименование поставщика лекарственного растительного сырья не совпадает с наименованием производителя, на упаковке дополнительно приводится информация о производителе.

Маркировка лекарственных растительных препаратов

Маркировку наносят на вторичную упаковку лекарственных растительных препаратов. Наносимая информация должна соответствовать требованиям действующего законодательства РФ.

Дополнительно на пачке с фильтр-пакетами указывают массу 1 фильтр-пакета, количество фильтр-пакетов.

Транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов

Лекарственное растительное сырье и лекарственные растительные препараты должны транспортироваться в сухих, чистых, не имеющих постороннего запаха, крытых транспортных средствах, либо в контейнерах.

Укладка упакованного лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов в транспортное средство/контейнер должна исключать повреждение упаковки в процессе транспортирования.

Отдельно от других видов лекарственного растительного сырья (в отдельной транспортной таре) транспортируется сырье, подлежащие раздельному хранению, согласно ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов» (например, эфиромасличное сырье в отдельной транспортной таре, предохраняющей от распространения запаха).

Если нет других указаний, то во время транспортирования

лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов допускаются кратковременные отклонения от рекомендуемых условий хранения.

Стабильность биологических лекарственных средств	**ОФС.1.1.0020.18** **Вводится впервые**

Настоящая общая фармакопейная статья устанавливает общие требования к исследованию стабильности биологических лекарственных средств (ОФС «Биологические лекарственные препараты») при определении срока годности, условий хранения, применения и транспортирования, при которых оцениваются возможные изменения значений показателей качества под влиянием факторов нестабильности.

Требования данной ОФС распространяются на биологические лекарственные средства (БЛС), а именно на иммунобиологические лекарственные препараты (ИЛП), биотехнологические лекарственные препараты (БтЛП), лекарственные препараты, полученные из крови, плазмы крови человека и животных (за исключением цельной крови). К БЛС в целом применимы требования ОФС «Стабильность и сроки годности лекарственных средств», однако они обладают целым рядом отличительных характеристик, которые необходимо учитывать при оценке их стабильности.

Требования данной ОФС не распространяются на антибиотики, аллергены, гепарины, витамины, цельную кровь или клеточные компоненты крови, генотерапевтические лекарственные препараты.

ОСНОВНЫЕ ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Основные термины и определения, используемые в настоящей статье, нашли отражение в ОФС «Стабильность лекарственных средств».

Биологическая фармацевтическая субстанция – фармацевтическая субстанция, произведенная с использованием биологического источника, которая должна быть охарактеризована с использованием физических,

химических и биологических испытаний и качество которой определяется этими испытаниями в сочетании с контролем процессов ее производства.

Конечный балк биологической фармацевтической субстанции для хранения (конечный балк) – биологическая фармацевтическая субстанция, полученная в непрерывном цикле производства, используемая для приготовления готовой лекарственной формы и предназначенная для хранения.

Стабильность БЛС - способность БЛС сохранять физические, физико-химические, биохимические и иммунохимические, биологические, биофармацевтические и фармакологические свойства в определенных границах на протяжении срока годности.

Факторы нестабильности - совокупность внешних условий и физических и химических процессов, протекающих в БЛС вызывающих изменение значений показателей качества.

Долгосрочные испытания стабильности – испытания, проводимые в соответствии с заявленными в нормативной документации условиями хранения БЛС с целью установления или подтверждения срока годности.

Ускоренные испытания стабильности – исследования, направленные на увеличение скорости химической деградации/разложения, деструкции или физического изменения БЛС путем использования усложненных условий хранения, для оценки влияния кратковременных отступлений от заявленных условий хранения.

Стрессовые испытания – испытания стабильности в стресс-условиях, проводимые с целью исследования вынужденного процесса разложения или деструкции (установления продуктов и механизмов разложения) БЛС.

Опытно-промышленная серия – серия биологической фармацевтической субстанции или биологического лекарственного препарата, которая соответствует и воспроизводит промышленный способ производства.

Промышленная серия – серия биологической фармацевтической субстанции или биологического лекарственного препарата, произведенная промышленным способом с использованием производственного оборудования на производственной площадке, указанной в производственно-промышленном регламенте.

Промежуточный продукт (полупродукт) - получают в процессе производства, при этом он не является лекарственной субстанцией или лекарственным препаратом, однако его получение является критическим этапом производства БЛС. Для успешного завершения такого критического этапа перед продолжением технологического процесса следует установить количество промежуточного продукта и требования к нему (внутренние спецификации) К промежуточным продуктам могут относиться вещества, подвергаемые дальнейшей молекулярной модификации или сохраняемые на протяжении длительного периода времени перед дальнейшей переработкой.

Промышленный масштаб производства. Производство с использованием промышленных мощностей, предназначенных для выпуска БЛС для реализации на рынке.

Опытно-промышленный масштаб производства. Производство относительно небольшого количества лекарственной субстанции или лекарственного препарата, полностью соответствующее применяемому в промышленном масштабе. За исключением масштаба производства все применяемые технологические стадии (размножение микробов, клеток, сбор продукта, стадии очистки и т.д.) должны быть идентичными используемым в промышленном масштабе.

Характеристики аналитической методики, необходимые при оценке результатов исследования стабильности БЛС - прецизионность (повторяемость и воспроизводимость), установленные при валидации аналитической методики. Прецизионность - степень близости друг к другу независимых результатов испытаний, полученных в конкретных регламентированных условиях.

Продукт деструкции или деградации (разложения) - молекула, возникающая в результате изменений биологической фармацевтической субстанции (конечный балк) с течением времени. При исследованиях стабильности БЛС подобные изменения могут возникать в результате обработки или при хранении (например, деамидирование, окисление, агрегация, протеолиз) БЛС. Некоторые продукты деструкции/деградации БЛС могут проявлять биологическую активность.

Примесь – любой компонент лекарственной субстанции (конечный балк) или лекарственного препарата (готовой лекарственной формы в первичной упаковке), который не является лекарственной субстанцией или вспомогательным веществом.

ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Действующим веществом для БЛС, являются живые и/или убитые бактерии, вирусы, анатоксины, а также антитела и антигены разного происхождения, протеины и/или полипептиды, гликопротеины, в том числе белки, полученные с помощью генной инженерии. В связи с белковой природой сохранение молекулярной структуры и, следовательно, биологической активности зависит от строгого соблюдения условий хранения. На качество и на срок годности БЛС большое воздействие оказывают изменение температуры, воздействие окислителей, света, ионного состава и др., оказывающие влияние на активность, чистоту, качество лекарственного средства. Например, белки в водных растворах подвержены:

- физическому воздействию (например, агрегации, осаждению и адсорбции и т.п.);
- химическому разложению (например, протеолизу, окислению и т.п.);
- воздействию среды на белки в первичной упаковке (поверхности как «воздух-жидкость» или «стекло-жидкость»);
- высокий негативный заряд поверхности стекла или гидрофобные силы пластикового контейнера могут вызывать усиленную агрегацию белка в растворе.

Предварительные данные, обосновывающие предполагаемый срок годности БЛС, должны быть обязательно получены в ходе долгосрочных испытаний (температура, влажность и т.д.).

Оценка стабильности БЛС может потребовать физико-химических, биохимических и иммунохимических методов для анализа молекулярной целостности и количественного определения продуктов разложения, входящих в программу изучения стабильности. Разработка надлежащей программы исследования долговременной стабильности является решающим фактором успешной разработки БЛП для выпуска в промышленном масштабе с постоянным обновлением первоначальных данных о стабильности.

ТРЕБОВАНИЯ К ВЫБОРУ СЕРИЙ БЛС ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ СТАБИЛЬНОСТИ

Конечный балк биологической фармацевтической субстанции для хранения или «полуфабрикат» (если препарат производится в непрерывном цикле). В случае хранения конечного балка или полуфабриката, полученных до заключительных этапов производства БЛС, должны быть предоставлены данные о стабильности не менее 3 серий, условия производства и хранения которых применимы для промышленного масштаба. При хранении конечного балка или полуфабриката более 6 мес, данные о стабильности должны быть представлены как минимум в течение 6 мес, при хранении менее 6 месяцев минимальный объем данных по стабильности определяется в каждом случае отдельно.

Биологическая фармацевтическая субстанция. Испытания по изучению стабильности фармацевтической биологической субстанции должны проводиться на не менее трех первичных промышленных сериях или не менее трех первичных опытно-промышленных сериях. При этом опытно-промышленные серии субстанции должны быть произведены по единой технологической схеме, с использованием способа производства, моделирующего окончательный процесс, который будет использоваться при

промышленном производстве. В процессе изучения стабильности субстанции должны храниться в контейнерах (первичной упаковке), которые полностью соответствуют таре, используемой в промышленном производстве. Использование контейнеров меньших размеров допускается, если они сделаны из того же материала и используют ту же систему контейнер/упаковка, что и предназначенные для полномасштабного промышленного производства.

Данные, полученные в ходе изучения стабильности опытно-промышленных серий фармацевтической биологической субстанции, могут быть использованы для установления срока годности, но при обязательном условии включения трех промышленных серий в программу долгосрочного изучения стабильности в дальнейшем. Качество серий субстанции, включенных в программу изучения стабильности, должно соответствовать качеству серии субстанции, использованной при производстве серии БЛП, применяемой в доклинических и клинических исследованиях, и требованиям, предъявляемым к промышленным сериям субстанции.

При условии хранения субстанции в течение некоторого времени до производства готовых БЛС необходимо провести изучение стабильности как минимум на трех промышленных сериях на протяжении 6 месяцев. Для субстанции с меньшими предполагаемыми сроками хранения длительность периода, за который предоставляются данные по изучению стабильности, определяется индивидуально в каждом конкретном случае. Следует учитывать, что верхний (крайний) предел срока хранения субстанции целесообразно подтверждать данными долгосрочных испытаний стабильности трех серий лекарственного препарата, произведенного из серии субстанции на конце срока годности.

Промежуточные продукты. При производстве БЛС (субстанций) большое значение имеет контроль качества промежуточных продуктов. Производитель должен их идентифицировать и установить собственные критические параметры технологического процесса, которые должны

соблюдаться и гарантировать стабильность получаемых промежуточных продуктов. Обычно эти исследования проводятся при масштабировании производства, но производитель должен подтвердить возможность экстраполяции полученных результатов на промышленный масштаб.

Биологический лекарственный препарат. Испытания по изучению стабильности БЛП должны проводиться не менее чем на трех промышленных сериях в первичной упаковке, соответствующей той, которая будет производиться в промышленном масштабе в долгосрочных испытаниях на весь заявленный срок годности. По возможности серии БЛП, отобранные для изучения стабильности, должны быть произведены из разных серий фармацевтической субстанции или конечного балка или «полуфабриката» (если препарат производится в непрерывном цикле). Качество серий БЛП, включенных в программу изучения стабильности, должно соответствовать качеству серий, используемых в доклинических исследованиях и клинических испытаниях. Результаты, полученные в ходе изучения стабильности опытно-промышленных серий БЛП, могут быть использованы, но только при условии включения трех промышленных серий в программу долгосрочного изучения стабильности с обязательным предоставлением в регуляторный орган полученных результатов.

При заявленном сроке хранения более 6 месяцев возможно проведение изучения стабильности как минимум на протяжении 6 месяцев. Для БЛП с меньшими предполагаемыми сроками хранения длительность периода, за который предоставляются данные по изучению стабильности, определяется индивидуально в каждом конкретном случае. Поскольку срок годности БЛП устанавливают на основании фактических долгосрочных исследований, проведенных в реальном времени и в реальных условиях хранения регистрационное досье следует непрерывно обновлять актуализированными данными по стабильности.

В случае, если для установления срока годности использовались данные, полученные для опытно-промышленных серий, а впоследствии было

обнаружено, что препарат, произведенный в промышленном масштабе, не выдерживает спецификации на долгосрочную стабильность, составленную по результатам хранения опытно-промышленных серий (т.е. информация по стабильности не подтвердилась), или что промышленные серии не аналогичны сериям, использовавшимся при доклинических исследованиях и клинических испытаниях, производитель обязан уведомить соответствующий регуляторный орган и определить программу дальнейших действий по устранению несоответствий.

Отбор образцов. В случае если серии БЛС различаются по номинальному объему (например, 1 мл, 2 мл или 10 мл), количеству ЕД (например, 10, 20 и 50 ЕД) или массе (например, 1 мг, 2 мг или 5 мг), образцы для включения в программу оценки стабильности могут быть выбраны на основе матричной системы и/или по методике крайних вариантов (брекетинга) согласно ОФС «Стабильность лекарственных средств».

Построение матриц, т. е., статистический план исследования стабильности, в ходе которого различные образцы исследуют в различных комбинациях факторов, следует применять только при предоставлении надлежащей документации, подтверждающей, что стабильность изучавшихся образцов соответствует стабильности всех образцов. Различия образцов одного и того же лекарственного препарата следует рассматривать как, например, различия в сериях препарата, дозировке, количестве препарата в упаковке и в ряде случаев как различия контейнеров/систем упаковки. Построение матриц нельзя применять к образцам, различия которых могут повлиять на стабильность, например, имеющим разные дозировки и упакованные в разные контейнеры/системы упаковки, когда невозможно доказать, что продукты одинаково выдержат установленные условия хранения.

Если одинаковая дозировка и упаковка используются для трех или более объемов наполнения, производитель может выбрать для оценки в программе стабильности только контейнеры с наименьшим и наибольшим

объемами (методика крайних вариантов - брекетинг). Дизайн протокола с брекетингом предполагает, что стабильность наибольшего и наименьшего образцов отражает соответствующие показатели для промежуточных вариантов (при этом срок годности устанавливают по наименьшему выявленному сроку годности). В ряде случаев могут потребоваться дополнительные сведения, доказывающие, что полученные при брекетинге данные можно экстраполировать на все образцы.

ОЦЕНКА СТАБИЛЬНОСТИ

При разработке Программы исследования и Протокола стабильности, следует учитывать возможность установления всех изменений в подлинности, чистоте и активности БЛС. Исследования биологической активности (если их проведение возможно) являются также частью основных исследований стабильности. Потребность включения тех или иных тестов зависит от конкретного БЛС и лекарственной формы. Для оценки стабильности БЛС могут потребоваться сложные аналитические методики. Все аналитические методики, на основании которых получены результаты изучения стабильности, должны быть валидированы.

Программа исследования стабильности содержит последовательный план проведения исследований изучения способности БЛС сохранять свое соответствие спецификации, гарантирующее качество в течение изучаемого срока при заданных условиях хранения. В программе указываются цель и план исследований стабильности, соответствующие физико-химические, биохимические и иммунохимические методы анализа активных веществ, а также количественный анализ продуктов деструкции/деградации (если чистота и молекулярные характеристики изучаемого продукта позволяют использовать эти методики). В отчете о работе по программе исследования стабильности указывается весь период до истечения срока годности БЛС и содержатся, в частности, следующие данные: цель исследования, наименование БЛС, номер(а) серии(й) для различных дозировок и разных размеров серий (где применимо); цикл производства БЛС, состав БЛС,

условия испытаний, периодичность испытаний (точки контроля во времени); описание условий хранения; данные о физических, химических, микробиологических и биологических методах испытаний и другие необходимые показатели, специфические для данного лекарственного препарата; критерии приемлемости; ссылки на методы испытаний; описание вида упаковки.

Протокол исследования стабильности должен содержать подробную оценку стабильности БЛС, устанавливающей условия хранения и срок годности БЛС. Протокол включает четко сформулированные спецификации и периоды между испытаниями, необходимую информацию, демонстрирующую стабильность БЛС, в течение всего предлагаемого срока годности. К протоколу прикладываются таблицы, в которых указываются наименование БЛС, производитель, номера серий, дата анализа, условия хранения, температура, упаковка. Кроме того приводятся фактические результаты анализа образцов не менее трех серий, полученные предприятием-изготовителем с применением методов контроля (согласно проекту нормативной документации), выдержанных в предписанных условиях определенное время, подтверждающие условия хранения и установленный срок годности.

Примечание: В таблице не должно быть общих выражений, как например, «выдерживают», «соответствует» (кроме раздела «Подлинность») - параметры должны соответствовать указанным в нормативной документации и содержать фактические данные.

Частота анализов. В связи с тем, что срок годности БЛС может варьировать от нескольких месяцев до нескольких лет, длительность исследований стабильности и частота анализов также варьируют:

- если предложенный срок годности не превышает 1 года, исследования стабильности в реальном времени следует проводить в течение первых 3 месяцев ежемесячно, а в оставшийся период - с трехмесячными интервалами;

- если предложенный срок годности больше 1 года, исследования

следует проводить каждые 3 месяца в течение первого года хранения, каждые 6 месяцев в течение второго года и далее ежегодно.

Несмотря на ряд исключений срок годности уже существующих препаратов и препаратов, которые могут быть получены в будущем, находится в диапазоне от 0,5 до 4 лет. Указанные временные интервалы применяют при оценке стабильности БЛС до его утверждения или регистрации, тогда как после утверждения или регистрации, когда уже будут получены данные, свидетельствующие о его адекватной стабильности, можно использовать сокращенный объем испытаний стабильности. Если согласно полученным данным стабильность препарата не нарушается, заявителю рекомендуется подать на рассмотрение протокол исключения отдельных этапов анализа (например, исследования через 9 месяцев) в долгосрочных исследованиях, проводимых после регистрации.

ВЫБОР ПОКАЗАТЕЛЕЙ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ СТАБИЛЬНОСТИ

Спецификации

На протяжении всего предлагаемого срока годности препарат должен соответствовать своим спецификациям в заданных пределах, однако БЛС в процессе хранения могут утрачивать активность, претерпевать физико-химические изменения или подвергаться деградации. Для каждого типа или группы БЛС максимальные допустимые потери активности, пороговые (предельно допустимые) значения физико-химических изменений/ деградации за предлагаемый срок годности подлежат рассмотрению отдельно для каждого препарата. Эти спецификации и заданные пределы должны быть разработаны с учетом всех имеющихся данных с использованием рекомендуемых статистических методов. Применение различных спецификаций для выпуска и на момент истечения срока годности должно быть обосновано достаточным объемом данных, свидетельствующих о том, что возможность клинического применения БЛП в течение этих сроков не изменяется.

Активность

Методы определения специфической (биологической) активности, где применяются, являются частью основных исследований стабильности. Действие БЛС, как правило, связано с проявлением биологической активности, исследования специфической/биологической активности должны стать частью изучения стабильности, т.к. биологическая активность представляет собой специфичную способность БЛС оказывать предполагаемое действие, приводящее к достижению ожидаемого эффекта. Определение активности основано на измерении определенного свойства действующего вещества при помощи подходящего количественного метода. Активность биологических препаратов, протестированную в различных лабораториях, можно достоверно сравнить, в случае если полученные значения выражены относительно соответствующего стандартного образца.

Исследование активности следует проводить с интервалами, заданными в протоколе изучения стабильности. Полученные результаты необходимо представить в виде единиц биологической активности, по возможности откалиброванных относительно стандартных образцов. При отсутствии национальных или международных стандартных образцов результаты анализа могут быть представлены в виде разработанных заявителем единиц, полученных на стандартном образце предприятия с изученными в установленном порядке характеристиками.

Активность некоторых БЛП зависит от конъюгации активного вещества(в)/компонента(в) со вторым компонентом или связывания с вспомогательным веществом. Диссоциация (высвобождение) активного компонента(ов) из такого комплекса должна изучаться в реальном времени и температурах (включая условия, встречающиеся в процессе транспортировки). Оценка стабильности таких препаратов по активности может быть затруднена, поскольку, в некоторых случаях испытания *in vitro* биологической активности и физико-химических характеристик неосуществимы или дают неточные результаты. Для нивелирования погрешностей при исследованиях *in vitro* необходимо разработать

надлежащую стратегию (например, испытание препарата до конъюгации/связывания или адсорбции, оценка высвобождения активного вещества из комплекса со вторым компонентом, количественное определение, основанное на тестах *in vivo*), или использовать/разработать методику испытания в качестве замены.

Чистота и молекулярные характеристики

Ввиду воздействия таких процессов, как дегликозилирование, дезамидирование или других, для оценки чистоты БЛС используют, как правило, не один, а несколько методов, а полученное значение, характеризующее чистоту, зависит от метода ее определения. При испытании на стабильность определение чистоты БЛС следует сосредоточить на методах определения продуктов деградации/распада. Степень чистоты так же, как и индивидуальные и суммарные количества продуктов распада БЛС, включенные в исследования стабильности, следует оформлять документально всякий раз, когда это возможно. Пороговые значения допустимой деструкции/деградации/распада активного вещества устанавливают на основании результатов анализа серий фармацевтической субстанции и лекарственного препарата, изучаемых (изученных) в доклинических и клинических исследованиях. При этом следует учитывать, что деградация БЛС на разных этапах длительного хранения может быть обусловлена различными факторами.

Применение адекватных физико-химических, биохимических и иммунохимических аналитических методов позволяет подробно охарактеризовать БЛС (молекулярный размер, заряд, гидрофобность и т.п.) и точно установить изменения, связанные с разложением, обусловленным деамидированием, окислением, сульфоокислением, агрегированием или фрагментацией в процессе хранения. К таким методам относят электрофоретические (электрофорез в полиакриламидном геле с SDS, иммуноэлектрофорез, Вестерн-блоттинг, изоэлектрическое фокусирование), хроматографические (эксклюзионная, обращенно-фазная, ионообменная или

аффинная высокоэффективная хроматография). В тех случаях, когда в процессе длительных, ускоренных и/или стрессовых исследованиях стабильности обнаруживают значительные качественные или количественные изменения, свидетельствующие об образовании продуктов распада, следует указать на возможность опасности, и на необходимость охарактеризовать и количественно определить продукты распада в рамках программы длительного исследования стабильности. Должны быть предложены и обоснованы допустимые пределы с учетом уровней, наблюдаемых в материале, использованном в доклинических и клинических исследованиях.

Для субстанций, которые не могут быть охарактеризованы надлежащим образом или препаратов, для которых точный анализ чистоты не может быть осуществлен с помощью стандартных методов, заявитель должен предложить и обосновать альтернативные процедуры тестирования.

Прочие показатели качества

Для БЛП, в потребительской упаковке необходимо провести исследования и представить отчет по показателям, не являющимся специфическими только БЛП:

- внешний вид продукта (цветность и степень мутности для растворов или суспензий);

- цветность;

- однородность и время восстановления для лиофилизатов и порошков;

- наличие видимых частиц в готовых растворах или после растворения порошков или лиофилизатов;

- pH;

- содержание влаги в порошках, таблетках и лиофилизатах;

- испытание на стерильность, микробиологическую чистоту или альтернативные исследования (например, оценка целостности контейнера/системы упаковки) - следует проводить как минимум дважды: в начале и в конце заявляемого срока годности.

Стабилизаторы, консерванты или другие вспомогательные вещества также могут подвергаться деградации/разложению в течение срока хранения лекарственного препарата. Если по результатам предварительных исследований стабильности обнаружены какие-либо признаки изменения или деградации таких материалов, неблагоприятно влияющие на качество лекарственного препарата, их также необходимо отслеживать в программе оценки стабильности.

Контейнер/система упаковки потенциально способны неблагоприятно повлиять на продукт, поэтому необходимо проводить тщательное исследование их пригодности.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ

Температура

При исследовании стабильности в реальном времени/реальном температурном режиме, условия хранения могут быть ограничены диапазоном температур, например, «от 2 до 8 ^{o}C» или «минус 20^{o}C», которые предлагаются для хранения БЛП или БЛС.

Влажность

БЛС обычно производятся в контейнерах с защитой от влажности. Если возможно подтвердить способность предлагаемых контейнеров (и условий хранения) обеспечить достаточную защиту субстанции или препарата от высокой и низкой влажности, испытания стабильности при различной относительной влажности допускается не проводить. Если такие контейнеры не используются, то необходимо проведение соответствующих испытаний стабильности согласно требования ОФС «Стабильность лекарственных средств».

Условия для ускоренных и стрессовых исследований

Срок годности БЛС должен быть установлен на основе данных, полученных в реальном времени при реальном температурном режиме. Применение ускоренного старения и в стрессовых условиях среды исследования методами «ускоренного старения» и «в стрессовых условиях

среды» для БЛС полезно проводить, поскольку полученные сведения могут быть использованы в дальнейшем:

- при внесении изменений в технологический процесс производства БЛП, в состав, увеличение масштабов выпуска, упаковки (сравнение «профиля распада» и подтверждение отсутствия различий в профилях примесей БЛС, выпущенного «до» и «после» внесения изменений процесс);

- для программы изучения стабильности или при формировании информации, которая может помочь объяснить профиль продуктов разложения субстанции или препарата;

- подбор показателей качества, которые могут служить наилучшими индикаторами стабильности продукта;

- при определение негативного влияния случайного воздействия условий окружающей среды (например, во время транспортировки);

- оценка влияния системы контейнер-укупорка на стабильность БЛС.

Исследования с воздействием на лекарственную субстанцию и лекарственный препарат экстремальных условий среды могут помочь выявить характер деструкции/разложения продукта. В рамках предлагаемых условий хранения следует проводить мониторинг таких изменений. Условия проведения исследований необходимо тщательно выбирать для каждого БЛС отдельно (ОФС «Стабильность и сроки годности лекарственных средств»).

Фотостабильность

Испытания фотостабильности проводят согласно ОФС «Стабильность и сроки годности лекарственных средств».

Исследование стабильности препарата после восстановления лиофилизированных БЛП

Стабильность лиофилизированных БЛП после восстановления должна быть продемонстрирована для условий хранения и максимального срока хранения, указанных на контейнерах/вторичных упаковках и/или в инструкции по медицинскому применению препарата согласно требованиям ОФС «Стабильность и сроки годности лекарственных средств». Маркировка

должна соответствовать требованиям ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения» и ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

Первичная упаковка (контейнер)/система укупорки контейнера

Качество БЛС может изменяться в результате взаимодействия между готовой лекарственной формой лекарственного препарата и контейнером/системой укупорки. Если для жидких продуктов невозможно исключить такое взаимодействие (например, для препаратов во флаконах), исследование стабильности продукта нужно проводить на образцах, хранящихся в перевернутом или горизонтальном положении (т. е. при контакте с пробкой), а также в вертикальном положении (норма) для определения воздействия системы укупорки на качество продукта. Необходимо предоставить данные о воздействии на продукт всех вариантов контейнеров/систем укупорки, предназначенных для реализации исследуемого продукта на рынке.

Кроме стандартных данных, необходимых для обычной ампулы для однократного применения, заявитель должен продемонстрировать, что система укупорки лекарственных средств для многократного применения устойчива к повторному открыванию/закрыванию. При этом следует показать, что препарат в полном объеме сохраняет свою активность, чистоту и качество на протяжении наибольшего периода, указанного на контейнерах, вторичных упаковках и/или в инструкции по медицинскому применению препарата. Упаковка и маркировка должны соответствовать требованиям ОФС «Стабильность и сроки годности лекарственных средств», ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения» и ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

МАРКИРОВКА

Для фармацевтических субстанций и лекарственных препаратов рекомендуется четко установленная температура хранения. Следует указать конкретные рекомендации по режиму хранения, особенно для субстанций и

лекарственных препаратов, которые нельзя замораживать. Эти условия должны быть указаны на контейнерах, упаковках и в инструкции по медицинскому применению препарата. При необходимости указывают также рекомендации по защите от прямых солнечных лучей или влажности окружающей среды при хранении. Такая маркировка должна соответствовать требованиям ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств» и ОФС «Стабильность и сроки годности лекарственных средств».

Валидация микробиологических методик **ОФС.1.1.0021.18**

Вводится впервые

Настоящая общая фармакопейная статья содержит общие подходы к валидации / верификации фармакопейных методик и альтернативных микробиологических методов.

Валидации подлежат вновь разработанные или усовершенствованные методы, а также те методики, которые используются для испытаний новых объектов, ранее не включенных в сферу их применения.

Методики, описанные в Государственной фармакопее, являются валидированными. Однако правильность их использования в условиях конкретной лаборатории должна быть подтверждена. Для этих целей, а также для оценки применимости методики испытания конкретного образца применяют процедуру верификации.

ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Валидация метода / методики испытания – документированное подтверждение обоснованности (правильности) выбора методики испытаний, гарантирующее получение ожидаемых и воспроизводимых результатов, соответствующих поставленной цели.

Верификация (оценка применимости) методики – экспериментальное доказательство того, что методика пригодна для достижения тех целей, для которых она предназначена, и может быть корректно воспроизведена в условиях конкретной лаборатории.

Валидационный параметр – характеристика метода (методики), определяемая в ходе валидационного / верификационного исследования и позволяющая охарактеризовать адекватность метода (методики).

Критерий приемлемости – заданное значение или ожидаемый результат определения валидационного параметра, которое используют для оценки адекватности метода (методики) путем сравнения с полученными экспериментальными данными.

Референсный метод – аттестованный метод, используемый в качестве стандартного для оценки правильности результатов определения, полученных с использованием других методов того же целевого назначения.

Альтернативный микробиологический метод – новый или усовершенствованный микробиологический метод, обеспечивающий оценку того же показателя качества, что и соответствующий референсный метод.

ОБЩИЕ ТРЕБОВАНИЯ

Валидацию / верификацию микробиологических методик проводят с использованием поверенного или аттестованного оборудования, установленного в контролируемых условиях микробиологической лаборатории.

Используют только материалы с известными характеристиками, подтвержденными документально. Тест-штаммы микроорганизмов должны обладать типичными культуральными, морфологическими, тинкториальными и другими биологическими свойствами. Питательные среды должны соответствовать требованиям к ростовым, селективным и дифференциально-диагностическим свойствам, установленным соответствующими статьями Государственной фармакопеи или определяемым для корректного воспроизведения методики.

Валидационные / верификационные исследования проводит обученный персонал с подтвержденным уровнем квалификации и опытом работы в области фармацевтической микробиологии.

1. Работа с тест-штаммами микроорганизмов

Для проведения валидационных исследований, оценки применимости методик испытания используются тест-штаммы микроорганизмов,

депонированные в официальных отечественных и зарубежных коллекциях, например:

– ГКПМ – Государственная коллекция патогенных микроорганизмов (Россия)
– ВКМ – Всероссийская коллекция микроорганизмов (Россия);
– РКПГ – Российская коллекция патогенных грибов (Россия);
– ATCC – Американская коллекция типовых культур (США);
– CIP – Коллекция культур Института Пастера (Франция);
– NCTC – Национальная коллекция типовых культур (Великобритания);
– NCPF – Национальная коллекция патогенных грибов (Великобритания);
– IHE – Коллекция Института гигиены и эпидемиологии (Чехия);
– DSM – Немецкая национальная коллекция (Германия).

Набор тест-штаммов микроорганизмов (табл. 1) для валидационного / верификационного исследования выбирают в соотвествии с задачами, для решения которых предназначен метод. В него включают микроорганизмы, использование которых регламентировано соответствующей статьей Государственной фармакопеи, и / или виды, которые наиболее адекватно позволяют оценить возможности метода.

Кроме того, могут быть использованы микроорганизмы, выделенные из производственной / лабораторной среды, контаминанты фармацевтических субстанций, вспомогательных веществ и готового продукта, в том числе, медленнорастущие виды и др.

Культуры микроорганизмов хранят в замороженном или лиофильно высушенном состоянии, на скошенных питательных средах или используют коммерческие готовые системы для их хранения. Тест-штаммы микроорганизмов в лиофилизированном виде в ампулах или в пробирках на питательной среде хранят при температуре от 2 до 8 ^{o}C; на бумажных дисках – при температуре не выше минус (18±2) ^{o}C. Готовые к использованию системы хранят в соответствии с инструкцией производителя.

Таблица 1 – Тест-штаммы микроорганизмов

Название микроорганизма	Номер штамма
Аэробные бактерии	
Bacillus subtilis	ГКПМ 010011; ATCC 6633; NCTC 10400; DSM 347
Bacillus cereus	ГКПМ 010014; ATCC 10702; NCTC 8035; DSM 487
Escherichia coli	ГКПМ 240533; ATCC 25922, ATCC 8739; NCTC 12923; NCTC 12241; DSM 1103; CIP 53.126
Salmonella enterica subsp. enterica serovar abony	ГКПМ 100329; NCTC 6017, CIP 80.39; IHE 103/39
Pseudomonas aeruginosa	ГКПМ 190155; ATCC 9027; NCTC 12924; CIP 82.118
Staphylococcus aureus	ГКПМ 201108; ATCC 6538; NCTC 10788
Staphylococcus epidermidis	ГКПМ 202001; ATCC 14990, ГКПМ 202004; ATCC 12228; NCTC 6513
Streptococcus pyogenes	ATCC 19615; NCTC 12696; CIP 1042.26; NCIMB 13285
Alcaligenes faecalis	ГКПМ 300205
Burkholderia cepacia	ATCC 25416; NCTC 10743; DSM 7288
Kocuria rhizophila	ATCC 9341; NCTC 8340
Yersinia enterocolitica	ATCC 9610; NCTC 12982; CIP 80.27
Дрожжевые и плесневые грибы	
Candida albicans	ГКПМ 303903; ГКПМ 303901; РКПГУ 401/NCTC 885-653; ATCC 10231; NCPF 3179
Aspergillus brasiliensis	РКПГГ 106; ATCC 9642, ATCC 16404, ВКМ F-1119; ВКМ F-3882; NCPF 2275
Анаэробные бактерии	
Clostridium sporogenes	ГКПМ 300524; ATCC 19404; NCTC 12935; DSM 1446
Clostridium novyi	ГКПМ 242484
Bacteroides vulgatus	ATCC 8482; NCTC 11154
Propionibacterium acnes	ATCC 11827; ATCC 6919; NCTC 737; DSM 1897

Подготовку и восстановление культур проводят в соответствии с инструкцией производителя или способом, описанным в ОФС «Микробиологическая чистота».

Перед использованием восстановленных тест-штаммов микроорганизмов для валидационного / верификационного исследования проводят их идентификацию на требуемом для целей исследования таксономическом уровне (до рода, вида и др.) и проверяют чистоту культуры.

Для испытания используют 18-24-часовые культуры микроорганизмов, выращенные на плотной питательной среде (бактерии культивируют на соево-казеиновом агаре, дрожжевые и плесневые грибы – на агаре Сабуро с глюкозой, или аналогичных им питательных средах).

Для стандартизации взвесей используют способы, описанные в ОФС «Определение концентрации микробных клеток».

Работу с готовыми коммерческими системами для идентификации микроорганизмов проводят в соответствии с инструкцией производителя.

2. **Выбор методики определения валидационных параметров. Критерии приемлемости**

Выбор валидационных параметров

Процесс валидации включает в себя обработку экспериментальных данных и оценку валидационных параметров, которые позволяют охарактеризовать адекватность выбранной микробиологической методики. К таким параметрам относятся правильность, прецизионность, специфичность, пределы обнаружения и количественного определения, линейность, устойчивость (робастность). При необходимости на основании полученных данных определяют рабочий диапазон метода.

Выбор валидационных параметров, оцениваемых в ходе исследований, определяется целевым назначением методики (табл. 2). Различают качественные, количественные микробиологические методы, а также методы идентификации микроорганизмов.

Таблица 2 – Характеристики, определяемые при валидации методов / методик

Параметр	Количественные методы	Качественные методы	Идентификация
Специфичность	+	+	–*
Предел обнаружения	–	+	–
Предел	+	–	–

количественного определения			
Рабочий диапазон	+*	–	–
Линейность	+	–	–
Правильность	+	–*	+
Прецизионность	+	–*	+
Устойчивость (робастность)	+	+	+

Примечание: * - может определяться по необходимости

При оценке применимости фармакопейных микробиологических методик набор определяемых параметров может быть уменьшен при условии его достаточности для подтверждения адекватности методики. Так, например, для верификации методики количественного определения микроорганизмов может быть достаточно оценки таких параметров, как правильность и прецизионность. Качественные методики можно считать верифицированными, если показана возможность определения целевых микроорганизмов.

Целесообразно планировать эксперимент так, чтобы соответствующие характеристики изучались одновременно, обеспечивая правильное и полное понимание возможностей метода. Для оценки нескольких параметров допустимо использовать один и тот же массив экспериментальных данных.

Все испытания проводят в стандартных, максимально приближенных к реальным условиям выполнения анализа качества лекарственных средств по микробиологическим показателям или другим процедурам, выполняемым в лаборатории.

Следует принимать во внимание, что каждый выбранный метод имеет свои особенности и ограничения и поэтому требует индивидуального подхода к разработке процедуры его валидации и установлению критериев приемлемости.

При изменении метода анализа, состава лекарственного средства или условий производства проводят повторную валидацию – ревалидацию.

Оценка валидационных параметров и критерии приемлемости

Результаты микробиологических исследований не подчиняются нормальному распределению и требуют математического преобразования перед статистической обработкой (например, логарифмирование или трансформацию с помощью квадратного корня).

Для статистической обработки экспериментальных данных может быть использовано специальное программное обеспечение.

Специфичность

Специфичность – способность метода определять перечень микроорганизмов, для выявления которых метод предназначен.

Методика определения. Для анализа используют репрезентативную группу микроорганизмов (грамотрицательные и грамположительные бактерии, споровые бактерии, дрожжевые или плесневые грибы). Исследование может включать в себя анализ смесей культур, угнетенных микроорганизмов, изолятов из производственной среды или клинически значимых штаммов.

Тест-штаммы для оценки специфичности выбирают с учетом назначения метода. Используют целевые микроорганизмы, для определения которых валидируемый метод предназначен, и штаммы-ассоцианты, рост которых не должен препятствовать выделению целевых бактерий или грибов. Для каждой исследуемой культуры выполняют не менее 3 определений. Концентрации клеток целевых микроорганизмов и штаммов-ассоциантов в рабочих взвесях должны отличаться на несколько порядков (например, количество целевых микроорганизмов – не более 10^2 КОЕ/мл, штаммов-ассоциантов – не менее 10^5 КОЕ/мл соответственно).

Смеси культур используют для доказательства того, что метод пригоден для выделения или количественного определения одного и более видов микроорганизмов.

При валидации альтернативных микробиологических методов, принцип которых не основан на обнаружении роста микроорганизмов, для оценки специфичности используют соответствующие вещества (например,

внеклеточную АТФ, ДНК, различные ингибирующие соединения и др.), которые могут оказывать влияние на результат определения.

Критерий приемлемости. Целевые микроорганизмы должны быть выделены или определены количественно с требуемым уровнем правильности и прецизионности. При этом должно быть показано, что штаммы-ассоцианты или посторонние соединения, присутствующие в образце, не оказывают влияния на результат определения.

Предел обнаружения

Предел обнаружения – минимальное количество клеток в образце, которые могут быть обнаружены с помощью валидируемого метода. Данный параметр оценивают для качественных микробиологических методик. При этом определяют исходную концентрацию клеток микроорганизмов в образце до стадий инкубации или накопления.

Методика определения. Для установления предела обнаружения используют один из подходов, описанных ниже.

1. Сравнение результатов, полученных с помощью валидируемой и референсной методик.

Для оценки используют инокулят, содержащий минимальную концентрацию тест-штамма. Готовят ряд последовательных разведений в теоретически определенном диапазоне.

Для каждого концентрационного уровня проводят не менее 5 параллельных определений референсным и валидируемым методами, выявляют долю положительных результатов и сравнивают полученные значения между собой. Устанавливают наименьшее количество клеток микроорганизма, которое может быть обнаружено в 50% случаев.

Для сравнения используют различные статистические критерии, например, χ^2 или точный критерий Фишера.

2. Сравнение результатов, полученных валидируемым методом, с соответствующей статистической моделью.

Для определения используют рабочую взвесь тест-штамма, содержащую минимальную выявляемую концентрацию клеток. Количество проб, из

которых микроорганизмы успешно выделяются, фиксируют и сравнивают с ожидаемым значением, полученным на основании статистической модели. Для этих целей используют биномиальное распределение, распределение Пуассона или др.

Пример:

Готовят последовательные разведения суспензии микроорганизмов до получения взвеси с минимальной концентрацией клеток, которую возможно обнаружить, после чего определенным объемом каждого разведения культуры инокулируют не менее 5 пробирок с жидкой питательной средой. Одновременно определяют фактическое количество внесенных клеток микроорганизма чашечным агаровым методом. После инкубации определяют, сколько пробирок каждого разведения дают положительный результат. Если предположить, что каждая жизнеспособная клетка в состоянии вызвать помутнение среды, то, исходя из распределения Пуассона, относительное число S пробирок, оставшихся прозрачными после внесения в пробирку m клеток, равно относительному числу пробирок, в которые не попало ни одной КОЕ. В этом случае $S = e^{-m}$.

При этом относительное число пробирок (P), ставших мутными, равно $P = 1 - S$ или $P = 1 - e^{-m}$. Так, если в образце содержится 1 КОЕ, то теоретически, рост должен быть обнаружен в 63% случаев.

3. Математический расчет

В некоторых случаях 50% предел обнаружения может быть определен математически, для чего используют обобщенную формулу Спирмена-Кербера (формула 1).

$$\mu = \sum_{i=1}^{k-1} (p_{i+1} - p_i) \cdot \frac{x_i + x_{i+1}}{2} \qquad (1)$$

где: μ – математическое ожидание среднего количества клеток – 50% предел обнаружения;
x_i – log концентраций вносимых клеток ($x_i < \ldots < x_k$);
k – количество концентрационных уровней;

p_i – доля положительных результатов в эксперименте с n_i количеством повторностей, которые анализировались отдельно для каждой концентрации.

Расчет доверительных интервалов для установленных значений предела обнаружения в этом случае проводят с помощью формулы 2.

$$var\ (\mu) = \sum_{i=2}^{k-1} [p_i/q_i/(n_i - 1)] \cdot \left[\frac{x_{i+1} - x_{i-1}}{2}\right]^2 \qquad (2)$$

где $q_i = 1 - p_i$ и $n_i \geq 2$.

Для корректного применения данной формулы необходимо соблюдать ряд условий:

– анализируют не менее 3 различных концентраций клеток микроорганизмов, выполняя не менее 3 определений;

– размер анализируемого образца должен быть одинаковым для каждого концентрационного уровня;

– должен быть получен хотя бы частичный положительный ответ как минимум для одного концентрационного уровня (в противном случае расчет доверительных интервалов будет невозможен);

– одна из выбранных концентраций должна обеспечивать 100% положительных результатов;

– одна из концентраций должна давать 0% положительных ответов – отрицательный контроль;

– равные интервалы между log концентраций и равное количество повторностей для каждого уровня предпочтительно, однако это условие не является обязательным.

Критерий приемлемости. Предел обнаружения валидируемого метода должен быть не выше, чем для референсного метода, т.е. количество клеток, определяемое валидируемым методом должно быть равным или меньшим, чем обнаруживаемое референсным методом.

Предел количественного определения

Предел количественного определения – минимальная концентрация микроорганизмов в образце, которая может быть определена в условиях эксперимента с приемлемым уровнем правильности и прецизионности. Данный параметр является характеристикой только методов количественного определения микроорганизмов.

Методика определения. Для анализа используют не менее 3 разведений суспензии микроорганизма, содержащей минимальное количество клеток. Проводят не менее 5 определений для каждой суспензии и устанавливают минимальное значение, при котором результат анализа может быть получен с требуемой правильностью и прецизионностью. Для сравнения валидируемого и референсного метода используют критерий χ^2 или др.

Критерий приемлемости. Предел обнаружения валидируемого метода должен быть не выше, чем для референсного метода.

Рабочий диапазон

Рабочий диапазон – интервал между минимальной и максимальной концентрациями, в котором количество клеток может быть определено с приемлемыми уровнями правильности и прецизионности.

Методика определения. Рабочий диапазон устанавливают, исходя из данных, полученных при оценке правильности и прецизионности валидируемого метода.

Для автоматизированных микробиологических методов исследования рабочий диапазон может варьироваться в зависимости от используемого оборудования.

Для традиционных чашечных агаровых методов максимальным приемлемым для количественного учета бактерий и дрожжевых грибов является число колоний, соответствующее 250 КОЕ/чаш., плесневых грибов – 50 КОЕ/чаш.

Установление рабочего диапазона может быть выполнено путем статистического сравнения результатов параллельных определений в ряду последовательных разведений суспензий микроорганизмов, которые готовят

таким образом, чтобы количество колоний составляло 250 КОЕ/чаш. для бактерий и дрожжевых грибов или 50 КОЕ/ чаш. для плесневых грибов. Делают ряд двукратных разведений до получения концентрации клеток около 1 КОЕ/чаш. Производят посев каждого разведения на чашки Петри и инкубируют в соответствующих условиях, после чего по формуле 3 сравнивают значения, полученные для двух последовательных разведений в ряду.

$$\frac{|2 \cdot X_{i-1} - X_i|}{\sqrt{2 \cdot X_{i-1} + X_i}} \leq 1{,}96 \qquad (3)$$

где: X_{i-1} – количество колоний на чашке при посеве из большего разведения, содержащего меньшую концентрацию клеток;

X_i – количество колоний на чашке при посеве из меньшего разведения, содержащего большую концентрацию клеток.

Полученные в ходе вычисления результаты не должны превышать 1,96. За верхнюю границу рабочего диапазона принимается значение X_i, которое удовлетворяет данному требованию. Нижняя граница определяется значением, при котором теряется возможность выделения микроорганизмов.

Критерий приемлемости. Должно быть показано, что требуемый уровень правильности и прецизионности обеспечивается на верхней и нижней границах рабочего диапазона, а также внутри него.

Линейность

Линейность – способность метода давать результат количественного определения, прямо пропорциональный концентрации клеток микроорганизмов в образце на всем рабочем диапазоне.

Методика определения. Анализируют не менее 3 различных концентраций микроорганизмов из исходной суспензии с определенной оптической плотностью, не менее, чем в 5 повторностях в рамках рабочего диапазона методики. Для установления линейности используют средние значения для каждой концентрации. Обработку результатов проводят с помощью корреляционного анализа.

По экспериментальным данным определяют коэффициент линейной корреляции R. Для этого используют формулу 4.

$$R = \frac{\sum_{i=1}^{n}(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^{n}(x_i - \bar{x})^2 \cdot \sum_{i=1}^{n}(y_i - \bar{y})^2}} \qquad (4)$$

Величина R^2 называется коэффициентом детерминации.

Критерий приемлемости. Линейность считают доказанной, если коэффициент линейной корреляции (R) не ниже 0,95, а коэффициент детерминации (R^2) не ниже 0,90.

Пример: Готовят рабочую взвесь тест-штамма микроорганизма с теоретической концентрацией клеток 100 КОЕ / мл. Делают ряд последовательных разведений до получения суспензий, содержащих 50; 10; 5 и 1 КОЕ/мл. Чашечным агаровым методом в пятикратной повторности определяют фактическое количество клеток в инокуляте. Средние значения, полученные для каждой суспензии, составляют: 89; 53; 7; 3; 1 КОЕ. Строят график зависимости десятичных логарифмов фактического содержания клеток (N) от теоретического содержания клеток (N_o) в виде линии тренда и устанавливают коэффициент детерминации R^2 (рисунок 1).

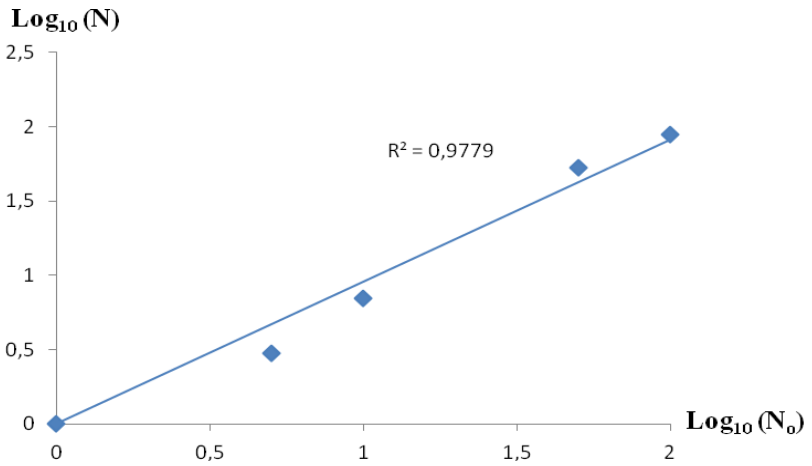


Рисунок 1. График зависимости полученных результатов определения фактического содержания клеток от теоретических значений

Как видно на данном примере, значение коэффициента детерминации R^2 не ниже 0,9. Таким образом, линейность считают доказанной.

Правильность

Правильность – близость полученных результатов к истинному (принятому опорному) значению. Характеризует систематическую ошибку.

Правильность выражают в процентах восстановления микроорганизмов (К) и определяют как отношение количества колоний, полученных с помощью валидируемой методики, к истинному (принятому опорному) значению (формула 5).

$$K = \frac{N}{N_0} \cdot 100\% \qquad (5)$$

где:
N – количество выделенных клеток (КОЕ);
N_o – истинное (принятое опорное значение) (КОЕ).

Истинным значением считают количество фактически внесенных клеток, определенное способами, которые описаны в ОФС «Определение концентрации микробных клеток», или результат, полученный референсным методом.

Методика определения. Готовят суспензию микроорганизмов с определенной оптической плотностью, делают ряд последовательных разведений (не менее 3), доводя концентрацию клеток до нижней границы исследуемого диапазона. Вносят подготовленные инокуляты в исследуемый образец, и производят параллельные испытания валидируемым и референсным методами, используя не менее 5 повторностей. Определяют процент восстановления для каждого разведения суспензии.

Критерий приемлемости. Процент восстановления должен составлять не менее 70 % от истинного значения.

Допускается проведение статистического сравнения с помощью параметрических или непараметрических критериев, а также дисперсионного анализа.

Для методов идентификации микроорганизмов валидационный параметр «правильность» оценивают по способности метода / системы

определять отдельные микроорганизмы на требуемом таксономическом уровне. В рамках испытания проверяют возможность получения ложноположительных и ложноотрицательных результатов, особенно для методов, устанавливающих фенотипический профиль. Например, метод / тест-система не должны давать результат идентификации для смешанных культур. Если подобное несоответствие обнаружено, исследователю следует подробнее изучить возможные ограничения метода / анализатора.

Прецизионность

Прецизионность – степень разброса отдельных результатов анализа в случае, когда методика используется для многократного исследования одной и той же суспензии микроорганизмов, а также различных суспензий в рамках рабочего диапазона. Характеризует случайную ошибку.

Прецизионность исследуют на однородных образцах и, в зависимости от условий, определяют повторяемость (сходимость) результатов; внутрилабораторную прецизионность или межлабораторную прецизионность (воспроизводимость).

Повторяемость микробиологической методики оценивают по независимым результатам, полученным в одинаковых регламентированных условиях в одной лаборатории (один и тот же исполнитель, одно и то же оборудование, один и тот же набор питательных сред и растворов) в пределах короткого промежутка времени, т.е. по результатам параллельных определений.

Внутрилабораторную прецизионность валидируемой методики определяют в условиях работы одной лаборатории (разные дни, разные исполнители, разное оборудование и т. д.).

Межлабораторную прецизионность (воспроизводимость) валидируемой методики оценивают при проведении испытаний в разных лабораториях.

Результаты экспериментальной оценки методики анализа по каждому из вариантов прецизионности выражают соответствующим значением относительного стандартного отклонения – коэффициента вариации (CV) по формуле 6.

$$CV = \frac{\sigma}{\overline{X}} \cdot 100\% \qquad (6)$$

где: σ – стандартное отклонение;

$\overline{X}$ – среднее выборочное значение.

Стандартное отклонение для выборки размером n определяют по формуле 7.

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum(X_i - \overline{X})^2}{n - 1}}, \qquad (7)$$

где: X_i – значение в выборке;

$\overline{X}$ – среднее выборочное значение.

При разработке оригинальной методики определяют повторяемость результатов, получаемых с ее использованием.

При необходимости включения разработанной методики в нормативную документацию дополнительно определяют ее внутрилабораторную прецизионность.

Межлабораторная прецизионность методики оценивается при предполагаемом ее включении в проект общей фармакопейной статьи, фармакопейной статьи или другой нормативной документации, носящей законодательный характер.

Методика определения. Из приготовленной суспензии микроорганизмов делают ряд последовательных разведений (не менее 3), доводя концентрацию клеток до нижней границы изучаемого диапазона. Производят посев исследуемого образца на питательные среды и выполняют не менее 5 определений с помощью валидируемого метода.

Вычисляют выборочное стандартное отклонение (σ) и коэффициент вариации.

Критерий приемлемости. Допустимым считают коэффициент вариации не более 35 %.

При проведении оценки альтернативного микробиологического метода проводят сравнение данных о прецизионности валидируемого и референсного методов. В этом случае критерием приемлемости служит значение коэффициента вариации стандартного метода.

Для методов идентификации микроорганизмов прецизионность считают доказанной, если результаты единичных определений согласуются между собой при многократном (не менее 5) исследовании одной и той же суспензии тест-штаммов микроорганизмов.

Устойчивость (надежность)

Устойчивость (робастность) – степень внутрилабораторной прецизионности или воспроизводимости результатов, полученных при испытании одних и тех же образцов в различных условиях (с использованием разного оборудования, серий питательных сред и т.д.).

Методика определения. Готовят суспензию микроорганизмов и проводят не менее 5 определений для каждого условия испытания, которое может оказать влияние на получаемый результат. Оценивают изменение прецизионности (коэффициента вариации) и правильности (процента восстановления микроорганизмов).

Критерий приемлемости. В ходе испытания должно быть показано, что различные изменения условий проведения методики не оказывают существенного влияния на результаты анализа. Если метод чувствителен к определенным изменениям, это считают его ограничением. Могут быть применены критерии приемлемости, статистический анализ и подходы к обработке данных, используемые при анализе других параметров.

Оценка применимости (верификация) фармакопейных микробиологических методик

Оценку применимости методики анализа лекарственного средства (ЛС) выполняют перед его испытанием по микробиологическим показателям. Допустимо проводить верификацию одновременно с оценкой качества образцов. Однако следует помнить, что в случае, если результаты проведения верификации окажутся неудовлетворительными, данные о качестве образца

должны быть признаны некорректными. При этом методика испытания требует модификации с последующим проведением повторной оценки возможности ее применения.

Процедура верификации должна воспроизводить предполагаемую методику анализа образца: способ пробоподготовки, питательные среды и растворы, количество промывной жидкости, условия инкубации и т.д. Размер образца, используемого при оценке применимости фармакопейных методик, должен быть тем же, что и для рутинного анализа.

При разработке методики микробиологического анализа конкретного лекарственного средства (за исключением иммунобиологических препаратов) выполняют следующие действия:

1. Определяют антимикробное действие образца согласно ОФС «Стерильность» или «Микробиологическая чистота».

2. Осуществляют подбор условий проведения испытания, например, требуемое разведение лекарственного средства, подходящий разбавитель, инактиватор антимикробного действия.

3. Проводят верификацию разработанной методики испытания с использованием целевых тест-штаммов микроорганизмов.

Важным этапом верификационного исследования является подтверждение того, что выбранный способ нейтрализации антимикробного действия не токсичен и не оказывает влияния на выделяемые микроорганизмы. Оценка применимости предполагаемого способа анализа лекарственного средства включает в себя сравнение степени восстановления жизнеспособных микроорганизмов из трех групп (табл. 3).

Таблица 3 – Контрольные группы для верификации способа нейтрализации антимикробного действия ЛС

Номер группы / Составные части	1	2	3
Лекарственное средство	+	–	–
Растворитель / разбавитель	+	+	–

Количество клеток микроорганизмов	+	+	+

1) В первой группе проводится пробоподготовка и испытание образца, инокулированного целевыми тест-штаммами микроорганизмов (при необходимости включается шаг нейтрализации антимикробного действия ЛС).

2) Испытание контрольной группы (положительный контроль) проводится аналогично, но в отсутствие лекарственного средства. Вместо образца используется соответствующий растворитель / разбавитель.

3) Контроль культуры позволяет установить фактическое количество клеток микроорганизмов в инокуляте, используемом в исследовании. В большинстве случаев определяется чашечными агаровыми методами.

Аналогичные результаты, полученные для групп 1 и 2, свидетельствуют об эффективности выбранного способа нейтрализации антимикробного действия лекарственного средства, между группами 2 и 3 – об отсутствии токсичности по отношению к определяемому виду микроорганизма.

4. Валидация альтернативных микробиологических методов

Альтернативные микробиологические методы включают способы прямого и непрямого определения микроорганизмов в исследуемых образцах и могут быть условно разделены на несколько групп:

- методы, основанные на детекции роста, где определению обычно предшествует стадия культивирования (электрохимические методы, АТФ-биолюминесценция, измерение потребленного или образовавшегося газа, микрокалориметрия и др.);
- методы прямого измерения, подразумевающие дифференциацию и визуализацию единичных клеток (проточная и твердофазная цитометрия, методика прямой эпифлуоресцентной микроскопии и т.д.);
- методы анализа клеточных структур и их компонентов, основанные на определении характерных соединений и непрямом установлении присутствия микроорганизмов (биохимические

тесты, иммунологические методы, способы установление профиля жирных кислот, отдельные виды спектроскопии и масс-спектрометрии, методики амплификации нуклеиновых кислот, риботипирование и др.)

Выбор альтернативного метода осуществляют, исходя из его целевого назначения, требуемой производительности, скорости получения результата, возможности его интеграции с автоматической системой управления лабораторной информацией, особенностей анализируемого образца и др.

Внедрение альтернативного микробиологического метода, реализованного в определенном оборудовании, включает в себя несколько этапов:

1. Квалификация монтажа (installation qualification – IQ). Выполняется производителем / поставщиком оборудования. Целью данного этапа является подтверждение того, что оборудование соответствует спецификации и сопровождается необходимым пакетом технической документации.

2. Квалификация функционирования (operational qualification – OQ). Также выполняется производителем / поставщиком оборудования для доказательства того, что работа всех компонентов системы или оборудования соответствует установленным требованиям. При OQ определяют критические условия / параметры оборудования / системы.

3. Квалификация эксплуатации (performance qualification – PQ). Данный вид работ выполняется пользователем и включает в себя несколько стадий:

3.1. Валидация метода с использованием тест-штаммов микроорганизмов (без образца). На данном этапе подтверждается, что конкретные лабораторные условия позволяют использовать метод анализа для получения воспроизводимых результатов.

3.2. Оценка применимости метода для анализа конкретного лекарственного средства с учетом его физико-химических особенностей.

3.3. Сравнительные испытания альтернативным и референсным методами.

5. Документальное оформление валидации / верификации

Валидационное / верификационное исследование выполняют, соблюдая три последовательных стадии:

– разработка и утверждение плана валидации метода / методики;

– проведение валидации в строгом соответствии с планом. При этом каждую процедуру оформляют документально;

– подготовка отчета о валидации с указанием всех замеченных отклонений и выводов с рекомендациями по их устранению.

Допускается оформление объединенного отчета о валидации, в который включают:

– полное описание методики, достаточное для воспроизведения, и отражающее все условия, необходимые для выполнения анализа;

– оцениваемые валидационные параметры;

– экспериментальные результаты проведенных исследований;

– материалы статистической обработки данных;

– иллюстративный материал (при наличии), такой как графики, рисунки и др.;

– заключение о возможностях и ограничениях метода.

Мерная посуда

ОФС.1.1.0022.18

Взамен ГФ X

Требования данной общей фармакопейной статьи распространяются на мерную посуду, используемую в фармакопейном анализе для измерения объема жидкостей. К мерной химической посуде относятся мерные колбы, пикнометры, пипетки, бюретки, а также мерные цилиндры, мерные стаканы, мензурки, пробирки с делениями. В отличии от химической посуды общего назначения мерная посуда имеет точную градуировку.

Виды мерной посуды

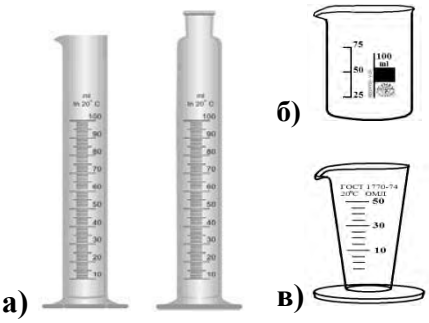


Рис. 1. Мерная посуда для приблизительных измерений:
а- цилиндры, **б**- стакан, **в**- мензурка

Мерные цилиндры (рис. 1 а) – стеклянные (могут быть пластиковые) толстостенные сосуды с нанесенными на внешней стенке делениями, указывающими объем в мл (5 – 2000 мл). Имеются цилиндры, снабженные притертыми пробками.

Градуированные мерные стаканы (рис. 1 б) дают самую большую ошибку в измерении объема из-за редких делений, указывающих объем.

Мензурки (рис. 1 в) сосуды конической формы на стенке которых нанесена шкала. Вместимость мензурок 50-1000 мл.

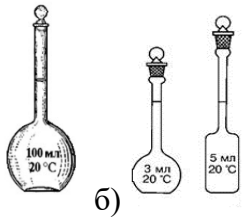
Пробирки с делениями - сосуд цилиндрической формы, имеющий полукруглое, коническое или плоское дно, объемом от 5 до 25 мл предназначены для химических реакций проводимых в малых объемах, биологических, микробиологических процедур, для отбора проб, отмеривания определенного объема наливаемой или выливаемой жидкости, или

определения объема осадка (центрифужные). Шкала, соответствующая вместимости пробирки, нанесена на всей боковой поверхности. Пробирки могут быть со шлифом, без шлифа, соответственно с пробками и без пробок.

К посуде для точного измерения объемов относят мерные колбы, мерные пипетки и бюретки.

Мерные колбы (рис. 2 а) представляют собой круглые плоскодонные сосуды, предназначенные для точного измерения объема (на вливание) при приготовлении растворов известной концентрации. Различают узкогорлые и широкогорлые мерные колбы. Диаметр горла (шейки) последних приблизительно в полтора раза больше по сравнению с узкогорлыми.

На шейке есть кольцевая метка, до которой следует наполнять колбу.



а) б)

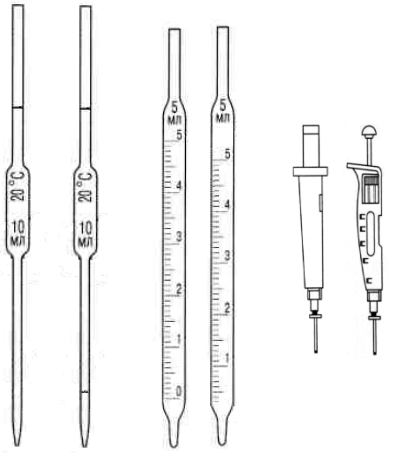
Рис. 2. Мерная колба (а), пикнометры (б)

В большинстве случаев мерные колбы имеют пришлифованные стеклянные пробки. Часто для закрывания мерных колб используют пробки из полиэтилена или из полипропилена.

Мерные колбы имеют вместимость 1, 2, 5, 10, 25, 50, 100, 200, 250, 500, 1000, 2000 $см^3$ и служат для *приготовления растворов с точной концентрацией*.

Пикнометры – мерные колбы с очень узким горлом вместимостью от 2 до 50 мл (рис. 2б). Пикнометр обязательно имеет пришлифованную пробку. Его используют для *определения плотности жидкости*.

Пипетки (рис. 3) представляют собой узкие длинные стеклянные трубки, оттянутые с одного конца, предназначены для точного измерения объемов растворов.



а) б) в) г) д) е)

Рис. 3. Мерные пипетки: неградуированные (а, б): градуированные (в, г); пипетки - дозаторы (д, е)

Различают следующие типы пипеток:

- неградуированные с одной кольцевой меткой - пипетки Мора (рис. 3 а) – откалиброванные на полный слив. Жидкость в них *набирают до кольцевой отметки* и *выливают до конца*;

- неградуированные с *двумя кольцевыми метками – пипетки Мора* (рис. 3 б) - жидкость в них *набирают до верхней метки* и *выливают до нижней*;

- *градуированные* (рис.3 в, г), на которых по всей длине есть деления; этими пипетками можно отмерять любой объем в пределах ее емкости, указанной на клейме.

Вместимость пипетки – обычно от 1 до 100 $см^3$ – указывается производителем в верхней или средней их части.

Пипетки вместимостью менее 1 мл называются *микропипетками*; с их помощью можно отбирать объемы, измеряемые десятыми и сотыми долями мл. Градуированные пипетки, у которых на шкале указан только минимальный (или максимальный) объем, называют пипетками на полный слив (рис.3 г), максимальный объем этими пипетками отбирают, выливая жидкость от верхнего деления до конца. Большое распространение получили более удобные и безопасные в обращении пипетки-дозаторы, гарантирующие высокую точность и повторяемость объема измеряемых жидкостей в пределах от 2 до 5000 мкл.

Унипипетки предназначены для измерения доз постоянного объема (рис. 3 д).

Варипипетки – это пипетки регулируемой емкости для измерения доз любого объема в указанных пределах (рис. 3 е). Дозаторы в этих пипетках

могут быть механическими и электронными. Набирают жидкость в пипетку, используя дозатор или резиновую грушу.

Бюретки - цилиндрическая стеклянная трубка с делениями, краном или зажимом, проградуированная в миллилитрах. Бюретки применяют для точного измерения небольших объемов и титрования при определении количественного содержания вещества.

Бюретки бывают двух типов:

тип I - без установленного времени ожидания 1-го и 2-го классов;

тип II - с установленным временем ожидания только 1-го класса.

Объемные бюретки (рис.4, а-г) с ценой деления в 0,1 мл позволяют вести отсчет с точностью до 0,02 мл. Бескрановые бюретки Мора (рис.4, б) имеют в нижней части резиновую трубку 1 с капилляром 2. Резиновая трубка пережимается либо зажимом Мора (рис.4, б), либо внутрь ее закладывают стеклянный шарик или палочку с шарообразным утолщением. Жидкость из такой бюретки вытекает при нажатии пальцами на верхнюю часть шарика.

У *бюретки с автоматическим нулем* (рис. 4, г) нулевой отметкой является верхний срез отростка.

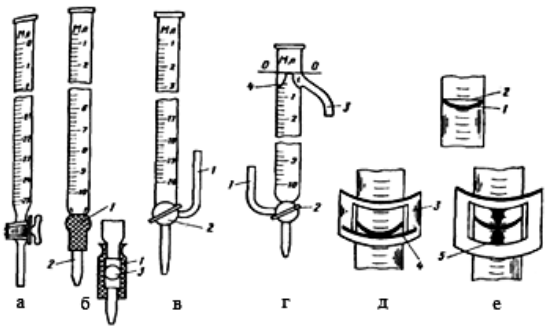


Рис.4 Бюретки:
(а)- с одноходовым краном
(б) - резиновой трубкой
(в) – двух-ходовым краном
(г) - автоматическим нулем
(д, е) - приспособления для отсчета объемов жидкости

Микробюретки отличаются от объемных бюреток небольшим обьемом (2 мл, 5 мл). Они имеют градуировку по 0,01 мл, что дает возможность делать отсчеты с точностью до 0,005 мл.

Материал

Стеклянная мерная посуда должна изготовляться из стекла, обладающего необходимыми химическими свойствами, обеспечивающими устойчивость к воздействию агрессивных сред, света и т.д.

Для производства стеклянной посуды используется боросиликатное стекло, в состав которого входят оксиды щелочных и щелочноземельных металлов (кальция, натрия или калия), добавляемые к кремнезему в основе обычного (силикатного) стекла. При их замене на оксид бора стекло приобретает особые свойства — низкий коэффициент линейного теплового расширения, повышенную химическую и механическую устойчивость.

Стекло, из которого сделана посуда, должно быть без видимых дефектов, а внутреннее напряжение должно быть снято до необходимых пределов.

Точность измерения вместимости мерной посуды

В лабораторных испытаниях используется отечественная мерная посуда 1 или 2 класса точности (в соответсвии с ГОСТ) или зарубежная мерная посуда А или В класса точности Международного стандарта (ISO). 1-й класс или класс А предназначен для более точных изделий, используемых при количественном определении; 2-й класс или класс В - для менее точных измерений.

Пределы погрешности измерения

Пределы погрешностей означают максимально допускаемую разность погрешностей между двумя любыми точками шкалы. Погрешности измерения сливаемой жидкости не должны превышать значений, указанных в табл. 1.

Таблица 1.

Номинальная вместимость, мл	Цена наименьшего деления	Предел погрешности для	
		1-класса	2-го класса
1	0,01	+0,01	±0,02
2	0,01	±0,01	±0,02
5	0,02	±0,01	±0,02
10	0,02	+0,02	±0,05

	0,05	±0,02	±0,05
25	0,05	±0,03	+0,05
	0,1	±0,05	±0,1
50	0,1	±0,05	±0,1
100	0,2	±0,1	±0,2

Калибровка лабораторной мерной посуды

Мерные колбы, пикнометры, пипетки и бюретки перед работой необходимо проверять. Перед проверкой мерную посуду тщательно моют и высушивают. Высушенную мерную посуду, используемую на "выливание" (пипетки и бюретки), перед проверкой смачивают водой очищенной: наливают ее в проверяемую посуду и дают постоять 1-2 мин, после чего выливают, как и при обычном использовании. Проверка мерной посуды заключается в определении массы воды очищенной, не содержащей примесей и растворенного воздуха, налитой в посуду до метки (мерные колбы и пикнометры) или вылитой из нее (пипетки и бюретки) при данной температуре и атмосферном давлении.

При проверке пипеток воду из них спускают в бюкс с крышкой и взвешивают. Не выливая воду из бюкса, спускают в него снова полную пипетку и взвешивают. Так поступают и в третий раз. Из трех значений массы воды берут среднее. При проверке бюреток измеряют массу всего ее объема, а затем - массу воды через каждые 10 мл. Для точной калибровки проверяют массу каждого миллилитра. Температура, при которой калибруется мерная стеклянная посуда, должна быть равна 20° С.На практике при калибровании и проверке мерной посуды пользуются таблицами, показывающими, сколько воды очищенной определенной температуры надо отвесить в воздухе той же температуры, чтобы объем ее соответствовал 1 л при 20^{o}С.

Таблица 1. Таблица массы 1 л воды, взвешенного в воздухе при помощи латунных гирь при разных температурах

Температура воды и воздуха в ^{o}С	Масса 1 л воды, г	Поправка на барометрическое давление
10	998,386	0,00144

11	998,315	0,00144
12	998,234	0,00143
13	998,143	0,00143
14	998,042	0,00142
15	997,925	0,00142
16	997,798	0,00141
17	997,659	0,00141
18	997,510	0,00140
19	997,349	0,00140
20	997,177	0,00140
21	996,995	0,00139
22	996,802	0,00139
23	996,599	0,00138
24	996,386	0,00138
25	996,164	0,00137
26	995,930	0,00137
27	995,689	0,00136
28	995,438	0,00136
29	995,177	0,00136
30	994,908	0,00135
31	994,630	0,00135
32	994,343	0,00134
33	994,048	0,00134
34	993,744	0,00133
35	993,433	0,00133

Данные таблицы рассчитаны на нормальное барометрическое давление (760 мм.рт.ст.) и на одну и ту же температуру воды и окружающего воздуха. Если барометрическое давление ниже нормального, на каждый миллиметр разницы прибавляют поправку, указанную в последнем столбце. Если барометрическое давление выше нормального, поправку вычитают.Допустимые погрешности от номинальной вместимости посуды при температуре 20 °С не должны превышать указанных в табл.2 и 3.

Таблица 2

Номинальная вместимость, $см^3$	Цена наименьшего деления шкалы	Пределы допустимой погрешности объема пипетки	
		1-го класса	2 класса
0,5	0,01	± 0,005	-
1	0,01	±0,006	±0,01
2	0,02	±0,01	±0,02
5	0,05	±0,03	±0,05

10	0,1	±0,05	±0,1
25	0,1	±0,1	-
	0,2	±0,01	±0,2

Таблица 3

Номинальная вместимость, $см^3$	Пределы допустимой погрешности объема				
	Колбы		Цилиндры		Мензурки
	1 класса	2 класса	1 класса	2 класса	
5	0,025	0,05	0,10	0,10	-
10	0,025	0,05	0,10	0,20	-
25	0,04	0,08	0,25	0,50	-
50	0,06	0,12	0,25	1,00	2,50
100	0,10	0,20	0,50	1,00	5,00
200	0,15	0,30	-	-	-
250	0,15	0,30	1,25	2,00	5,00
300	0,20	0,40	-	-	-
500	0,25	0,50	2,50	5,00	12,50
1000	0,40	0,80	5,00	10,00	25,00
2000	0,60	1,20	10,00	20,00	-

Для посуды второго класса допустимые пределы погрешностей увеличены вдвое.

Работа с мерной посудой

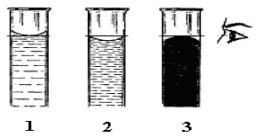
Объем жидкости можно измерить с различной степенью точности, которая определяется задачей анализа. В зависимости от относительной погрешности, допускаемой при измерении объема, мерная посуда делится на две группы – для приблизительного и точного измерения объема. К посуде для приблизительного измерения объема относятся мерные цилиндры, градуированные лабораторные стаканы, мензурки, пробирки с делениями. Относительная погрешность при измерении объема с помощью такой посуды составляет 1 % и более. Данная посуда предназначена в основном на выливание. Термин «на выливание» означает, что если перелить содержимое заполненного мерного сосуда в другой сосуд, то объем вылитой жидкости при

комнатной температуре будет соответствовать вместимости, обозначенной на сосуде.

Мерные цилиндры, градуированные мерные стаканы, мензурки, пробирки с делениями. Чтобы отмерить нужный объем жидкости, ее наливают в мерный сосуд до тех пор, пока нижний край мениска не достигнет уровня нужного деления.

Мерные колбы. На каждой мерной колбе указана та температура, при которой она имеет точно обозначенный на ней объем. Термин «на вливание» означает, что если наполнить мерную колбу жидкостью точно до метки, то объем жидкости при комнатной температуре будет соответствовать вместимости, обозначенной на колбе.

Объем вылитой из колбы жидкости будет несколько меньше помеченного, так как часть ее останется на стенках. Поэтому обычные мерные колбы не пригодны для отмеривания точного объема жидкости с последующим выливанием ее. Мерные колбы, предназначенные для выливания, имеют две метки. Верхняя метка предназначена «для выливания», т. е. если наполнить колбу до этой метки и вылить содержимое, вылитая жидкость будет иметь объем, указанный на колбе. Раствор, находящийся в колбе, доводят до метки в несколько приемов. Сначала наливают воды на 0,5 – 1 см ниже метки, затем, при помощи пипетки жидкость приливают по каплям до тех пор, пока край мениска раствора не коснется метки.



а) б) в)

Рис. 5. Правильное положение мениска:

а- прозрачный водный раствор;

б- мутный или окрашенный водный раствор;

в-раствор органической жидкости, плохо смачивающей стекло.

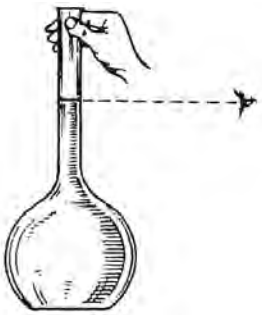


Рис.6. Наблюдение за правильностью установки мениска в мерной колбе

Для *прозрачных водных растворов* касаться метки должен *нижний край* мениска, для *мутных и ярко окрашенных* водных растворов – *верхний* (рис. 5). При этом колбу держат перед собой *за верхнюю часть* шейки так, чтобы *метка находилась на уровне глаз* (рис.6). В колбе большого объема (500 – 2000 мл) доводить до метки раствор следует, размещая колбу на ровной горизонтальной поверхности. Нельзя держать колбу за ее нижнюю часть, так как может произойти искажение объема за счет тепла, сообщаемого рукой.

Растворитель, как и раствор в колбе, должен иметь комнатную температуру. Доводить до метки горячие или холодные растворы нельзя, т.к. плотность жидкостей зависит от температуры и, следовательно, определяемый объем будет отличаться от объема, указанного на мерной колбе. Спиртовые, водно-спиртовые растворы и растворы органических растворителей доводят до метки после выдерживания их в течение 20 мин при 20^{o} С.

После доведения уровня жидкости до метки колбу закрывают пробкой, и, придерживая последнюю большим или указательным пальцем правой руки или ладонью, хорошо перемешивают полученный раствор, переворачивая колбу вверх-вниз не менее 7 – 10 раз. Несмотря на то, что после перемешивания уровень жидкости в мерной колбе опускается ниже кольцевой метки, т.к. часть раствора остается на пробке, доводить еще раз уровень жидкости до кольцевой метки после перемешивания нельзя.

При необходимости нагревают растворы в мерных колбах на водяной бане (до температуры, указанной в нормативном документе), затем перед

доведением раствора до метки, колбы охлаждают и выдерживают при температуре 20^{o} С в течение 20-30 минут.

Мерные пипетки. Набирают жидкость в пипетку, используя дозатор или резиновую грушу.

Для наполнения любой пипетки уровень жидкости должен быть на 2-3 см выше метки. Пипетку следует держать строго вертикально, приподняв над раствором таким образом, чтобы метка находилась на уровне глаз, жидкость выпускать по каплям, пока край мениска раствора не совпадет с меткой. Далее пипетку переносят в другой сосуд, прикасаясь ее нижним концом к внутренней поверхности этого сосуда, и дают жидкости медленно стечь. При быстром выливании жидкости значительная часть ее останется на стенках пипетки. Остаток жидкости (для пипеток с одной меткой или на полный слив) удаляют прикосновением кончика пипетки к краю наклоненного сосуда в течение нескольких секунд, затем слегка поворачивают пипетку вокруг оси. Остаток жидкости из пипетки выдувать нельзя, так как этот объем не учитывается при градуировке мерной посуды. В случае полного выливания до носика, необходимо выдержать 15 с до удаления пипетки из приемного сосуда.

Объемные бюретки. Перед началом работы бюретку два раза промывают водой очищенной и дважды ополаскивают раствором, который в ней будет находиться.

Подготовленную к работе бюретку закрепляют вертикально в штативе, затем заполняют бюретку раствором через воронку с коротким концом, не доходящим до нулевого деления. Если бюретка имеет двух-ходовой кран 2 (рис.4, в), то заполнение проводят, присоединяя к изогнутой трубке резиновый шланг от склянки с раствором. Бюретку наполняют жидкостью на несколько миллиметров выше нулевой линии и устанавливают опускающийся мениск на этой линии. Затем раствор спускают так, чтобы он заполнил бюретку до конца носика.

В бюретки со стеклянным краном забор жидкости осуществляется путем засасывания грушей через верхнее отверстие при открытом кране. Для удаления пузырьков воздуха кончик бюретки с резиновой трубкой поднимают под углом, слегка открывают зажим и выпускают жидкость до тех пор, пока весь воздух не будет удален.

Бюретку устанавливают на нуль *только после того*, как убедятся, что кончик бюретки заполнен раствором. Воронку, с помощью которой в бюретку наливают раствор, удаляют. Капли, оставшиеся на воронке, могут увеличивать объем жидкости в бюретке, что может привести к неправильному результату анализа.

Во время титрования нельзя касаться носиком бюретки стенок приемного сосуда. Каплю, оставшуюся на носике после завершения выливания, добавляют к вылившемуся объему прикосновением к внутренней стороне приемного сосуда. Если для бюретки не установлено время ожидания, дожидаться стекания жидкости, оставшейся на стенках, не нужно.

Время выливания не должно превышать 45 с для бюреток объемом 1 мл. Для некоторых бюреток 1 класса (класса А) установлено время ожидания 30 с. Только после этого раствор в бюретке устанавливают на нулевое деление, при этом в нижней ее части не должно остаться ни одного пузырька воздуха. Если они останутся, объем жидкости, пошедшей на титрование, будет определен неправильно.

При заполнении объемных бюреток (а также другой мерной посуды) легко пенящимися жидкостями время ожидания для оседания пены должно быть длительным – до исчезновения последнего пузырька, а доведение до мениска осуществляется осторожно по стенкам заполняемого сосуда. Местом отсчета уровня раствора в бюретке всегда выбирают нижний край мениска (рис.4, д). По этому краю и калибруют бюретку. Только в случае непрозрачных растворов (водный раствор $KMnO_4$, раствор I_2 в водном растворе KI и др.) необходимо делать отсчет по верхнему краю мениска.

В бюретку с автоматическим нулем раствор, подаваемый снизу через трубку, поднимается до верхнего среза отростка, избыток его будет стекать из бюретки через трубку (рис.4). После прекращения подачи раствора уровень его установится автоматически на верхнем срезе отростка. Первую метку на шкале такой бюретки обозначают 1 мл. Стеклянные краны бюреток должны быть очень слабо смазаны вазелином или сплавом ланолина с воском. Особенно опасна обильная смазка у микробюреток, поскольку она может подниматься вверх по бюретке и, загрязняя внутреннюю поверхность ее, нарушает нормальное смачивание стенок бюретки раствором.

Растворы едких и углекислых щелочей держат в бюретках с зажимами, так как при хранении этих растворов в бюретках со стеклянными кранами часто происходит «заедание» кранов. Верхний конец бюретки закрывают от попадания пыли и испарения раствора маленьким стаканчиком или широкой, но короткой пробиркой.

Установка мениска

Перед каждым титрованием нужно обязательно установить уровень жидкости в бюретке на нулевое деление шкалы. Отсчет объема по бюретке проводят по соответствующему краю мениска (рис. 5), при этом глаза наблюдателя должны находиться на уровне мениска во избежание ошибки измерения.

Точное определение нижнего края мениска затруднено явлением отражения, возможны погрешности и от параллакса (относительное смещение мениска вследствие перемещения глаза наблюдателя), если глаза не будут находиться точно на высоте мениска. У мерных колб и пипеток метка окружает горло или трубку целиком, что позволяет взять точный отсчет. У бюреток же метка занимает только часть окружности трубки. Поэтому для правильного отсчета уровня раствора в бюретке применяют разные приспособления. Например, держат позади бюретки кусок белого картона или

матовую стеклянную пластинку, либо надевают на бюретку бумажную рамочку (рис.4 д,е).

Мытье мерной посуды

Мытье мерной посуды проводят аналогично обычной лабораторной химической посуды последовательно выполняя следующие процедуры:

- *предварительные работы;* перед замачиванием салфеткой/фильтровальной бумагой удаляют смазку с кранов бюреток и соединений (если имеются), другие жировые пятна и надписи, сделанные во время работы;

- *замачивание и мытье* в моющем растворе; срок годности раствора для замачивания посуды – 24 часа, повторное использование этого раствора не допускается;

- *ополаскивание* - проводят проточной водопроводной водой, а затем три раза дистиллированной водой;

- *контроль чистоты посуды* проводят визуально; стеклянная посуда считается чистой, если вода не оставляет капель на внутренних стенках.

Для мытья мерной посуды в зависимости от характера загрязнений используют:

- *ультразвуковые бани,*

- *органические растворители (полярные и неполярные);*

- для мытья используют растворители категории чда, а для ополаскивания - растворители категории хч; при этом должны соблюдаться строгие меры безопасности (работа в вытяжном шкафу и др), так как большинство органических растворителей токсичны и легко воспламеняемы;

- *кислоты и окислители (*концентрированные хлористоводородная, серная, азотная или хромовая кислоты, или их растворы).

Примечание. Работу с кислотами проводят в вытяжном шкафу. Раствором аммиака нельзя ополаскивать посуду, в которой проводятся работы с органическими растворителями.

Использование дихромовой кислоты («хромпик»):

Дихромовая кислота очень агрессивна, в связи с чем, требуется проведение особого комплекса мероприятий по уничтожению отходов. В качестве замены возможно использование коммерческих кислотосодержащих растворов или смеси кислот, указанных выше.

Примечание. При работе с дихромовой кислотой следует соблюдать особую осторожность. Отработанную дихромовую кислоту сдают в соответствии с правилами, принятыми в лаборатории.

Сушка посуды

После ополаскивания посуду переворачивают вверх дном, для чего используют специальную доску с колышками, на которые надевают вымытую посуду и оставляют при комнатной температуре до тех пор, пока она не высохнет. Чистые пипетки после мытья и сушки помещают в специальные подставки (штативы).

Примечание. При указании производителя допускается сушить мерную посуду в сухожаровом шкафу при температуре, рекомендованной производителем.

В случае крайней необходимости посуду высушивают с помощью ополаскивания ацетоном или этанолом категории хч. Остатки растворителей собирают и сдают в соответствии с правилами, принятыми в лаборатории.

Родственные примеси в фармацевтических субстанциях и лекарственных препаратах	**ОФС.1.1.0023.18** **Вводится впервые**

В настоящей фармакопейной статье приведены требования к контролю родственных примесей в фармацевтических субстанциях и лекарственных препаратах, преимущественно синтетического и минерального происхождения.

Родственные примеси – технологические примеси и продукты деструкции действующего вещества. Родственные примеси и аналитические методики их определения описываются в соответствующем разделе фармакопейных статей на фармацевтические субстанции и лекарственные препараты.

В лекарственных препаратах и фармацевтических субстанциях должен осуществляться контроль родственных примесей, поскольку присутствие посторонних веществ в лекарственных средствах может влиять на их терапевтическую эффективность и безопасность.

Для аналитических методик, используемых для определения содержания примесей в лекарственных средствах, должна быть подтверждена их пригодность в соответствии с ОФС «Валидация аналитических методик».

При невозможности обнаружения и количественного определения каждой примеси в отдельности с помощью единой аналитической методики, допустимо использование нескольких методик для их контроля.

ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Примесь: любой компонент лекарственного средства, который не является фармацевтической субстанцией и/или вспомогательным веществом.

Продукт деструкции: примесь, образующаяся в результате химического изменения фармацевтической субстанции в процессе производства и/или хранения лекарственного средства, и возникающая в результате воздействия, например, света, температуры, pH, воды или взаимодействия с материалом первичной упаковки и укупорочных средств.

Технологическая примесь: примесь, присутствие которой обусловлено технологическим процессом производства фармацевтической субстанции.

Идентифицированная примесь: примесь с установленным химическим строением.

Неидентифицированная примесь: примесь, структура которой не установлена, и которая определяется исключительно качественными аналитическими параметрами (например, относительным временем удерживания).

Специфицируемая примесь: примесь, которая указывается отдельно и имеет собственный критерий приемлемости. Специфицируемая примесь может быть идентифицированной или неидентифицированной.

Неспецифицируемая примесь: примесь, которая не указывается отдельно и ее содержание нормируется общими критериями приемлемости.

Контролируемый предел: предел, выше которого примесь должна контролироваться.

Предел идентификации: предел, выше которого примесь должна быть идентифицирована.

Квалификация: процесс получения и оценки данных с целью определения биологической безопасности отдельной примеси или определенного профиля примесей.

Предел квалификации: предел, выше которого должна быть проведена квалификация примеси.

РОДСТВЕННЫЕ ПРИМЕСИ В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ СУБСТАНЦИЯХ

В фармацевтических субстанциях контролируются родственные примеси, обусловленные процессом ее производства (исходные вещества, промежуточные продукты, продукты побочных реакций) и/или хранения. Данные примеси могут быть идентифицированными или неидентифицированными.

Контроль родственных примесей осуществляется в соответствии с фармакопейными статьями на фармацевтические субстанции. Если фармацевтическая субстанция содержит примеси, отличные от указанных в фармакопейной статье, необходимо применить требования ОФС «Фармацевтические субстанции» в отношении идентификации и контроля примесей в ней, а также проверить пригодность методики, описанной в фармакопейной статье, для контроля данных примесей.

При отсутствии фармакопейной статьи на фармацевтическую субстанцию необходимость контроля, идентификации и квалификации родственных примесей в ней определяется в соответствии с ОФС «Фармацевтические субстанции», раздел «Родственные примеси» (Таблица 1 и Таблица 2).

Более высокие пределы содержания примесей в субстанциях могут быть установлены только при наличии соответствующего обоснования, подтверждающего безопасность заявляемой нормы содержания отдельной примеси или определенного профиля примесей. Для высокотоксичных (например, генотоксичных) примесей или примесей, которые вызывают нежелательные фармакологические эффекты, должны применяться более низкие пределы содержания с учетом параметров их безопасности.

РОДСТВЕННЫЕ ПРИМЕСИ В ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТАХ

В лекарственных препаратах контролируются продукты, образующиеся в результате деструкции действующего вещества (фармацевтической субстанции) или при взаимодействии действующего вещества с

вспомогательными веществами или с материалом первичной упаковки и укупорочных средств. Данные примеси могут быть идентифицированными или неидентифицированными. К родственным примесям в лекарственных препаратах не относятся примеси, которые образуются из вспомогательных веществ или экстрагируется из первичной упаковки и укупорочных средств.

Пределы контроля, идентификации и квалификации родственных примесей для лекарственных препаратов в зависимости от максимальной суточной дозы препарата приведены в табл. 1.

Таблица 1 – Ориентировочные пределы содержания продуктов деструкции в лекарственных препаратах

Максимальная суточная доза[1]	Предельное содержание примеси[2,3]
Контролируемый предел	
≤ 1 г	0,1 %
>1 г	0,05 %
Предел идентификации	
< 1 мг	1,0 % или 5 мкг суточного потребления примеси (что меньше)
1 мг – 10 мг	0,5 % или 20 мкг суточного потребления примеси (что меньше)
> 10 мг – 2 г	0,2 % или 2 мг суточного потребления примеси (что меньше)
> 2 г	0,10 %
Предел квалификации	
< 10 мг	1,0 % или 50 мкг суточного потребления примеси (что меньше)
10 мг – 100 мг	0,5 % или 200 мкг суточного потребления примеси (что меньше)
> 100 мг – 2 г	0,2 % или 3 мг суточного потребления примеси (что меньше)
> 2 г	0,15 %

Примечания:

1 – количество фармацевтической субстанции, вводимое пациенту в течение суток;

2 – предельное содержание для продуктов деструкции выражается либо в

Максимальная суточная доза[1]	Предельное содержание примеси[2,3]
процентном содержании по отношению к фармацевтической субстанции, либо в суточном потреблении примеси. Более низкие пределы содержания примеси устанавливаются, если продукт деструкции обладает повышенной токсичностью; 3 – выбор более высокого предела содержания должен быть научно обоснован с учетом безопасности примеси.	

В лекарственных препаратах контроль технологических примесей, не являющихся продуктами деструкции фармацевтической субстанций, как правило, осуществляется, если содержание токсичной технологической примеси в лекарственном препарате превышает контролируемый предел.

В лекарственных препаратах, содержащих два и более действующих вещества, в случае если отнесение неидентифицированных примесей к одному или другому действующему веществу затруднено, то их оценку рекомендуется проводить относительно действующего вещества с наименьшим содержанием.

Уменьшение риска передачи возбудителей губчатой энцефалопатии животных при применении лекарственных средств

ОФС.1.1.0024.18

Вводится впервые

Настоящая общая фармакопейная статья содержит общие требования к уменьшению риска передачи возбудителей губчатой энцефалопатии животных лекарственным средствам (ЛС), полученным из тканей или секретов животных, зараженных инфекционной губчатой энцефалопатией.

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на все материалы и вещества, полученные от животных и человека, вещества (действующие или вспомогательные), входящие в состав ЛС или используемые в процессе производства ЛС.

Риск передачи возбудителей губчатой энцефалопатии (ГЭ) животных вероятен для всех лекарственных средств, при производстве которых используются исходное сырье и материалы, полученные из тканей или секретов животных и человека, либо на этапах процесса производства путем внесения в их состав материалов биологического происхождения.

Требования к снижению риска передачи возбудителей ГЭ животных устанавливаются уполномоченным органом в соответствии с требованиями действующих нормативных правовых актов и критериев оценки статуса страны, установленные Всемирной организацией по охране здоровья животных.

ОСНОВНЫЕ ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Сырье животного происхождения – органы, железы, ткани и жидкости, полученные от животных, признанных здоровыми по результатам ветеринарно-санитарной экспертизы.

Прион – мембранный белок PrP^{Sc} (Prion Protein) с аномальной третичной структурой, не содержащий нуклеиновые кислоты, в основном, экспрессирующийся в клетках центральной нервной системы и лимфоретикулярной ткани.

Прионные болезни – это фатальные инфекционные состояния, вызываемые проникновением в организм извне (через пищеварительный тракт или парентерально) конформационной матрицы белка PrP^{Sc}, имеющей патогенную конформацию. При взаимодействии PrP^{Sc} с нормальным клеточным белком происходит их модификация, приводящая к тяжелым нейродегенеративным процессам.

Трансмиссивные губчатые энцефалопатии (ТГЭ) – хронические дегенеративные неврологические заболевания, характеризующиеся накоплением аномальных изоформ белка PrP^{Sc}. Данная группа заболеваний людей и животных принадлежит к медленным инфекциям (инкубационный период может длиться до нескольких лет) и характеризуется поражением центральной нервной системы, мышечной, лимфатической и других систем с последующим летальным исходом.

Виды животных, подверженных ТГЭ: крупный рогатый скот, овцы, козы, лоси, олени и животные, которые в природе восприимчивы к возбудителям трансмиссивной губчатой энцефалопатии или инфекции, передающейся преимущественно фекально-оральным путем.

ТГЭ болезни животных – губчатая энцефалопатия крупного рогатого скота (ГЭКРС), скрейпи (почесуха) овец и коз, болезнь хронического истощения (БХИ) у оленей и лосей, трансмиссивная энцефалопатия норок, губчатая энцефалопатия кошачьих (особенно у домашних кошек и больших

животных семейства кошачьих, содержащихся в неволе), экзотическая губчатая энцефалопатия копытных, содержащихся в зоопарках.

ТГЭ болезни людей – различные формы болезни Крейцфельда-Якоба, Куру, синдром Герстманна-Штройслерг-Шейнкера, фатальная (хроническая) семейная бессонница.

Инактивация – стадия/стадии производственного процесса, в ходе которых уменьшается активность PrP^{Sc} и способность вызывать заражение.

Страна происхождения – страна или страны, на территории которых животное родилось, было выращено и/или умерщвлено.

Оссеин – главная органическая часть костной ткани.

ТРЕБОВАНИЯ К ИСХОДНОМУ СЫРЬЮ И МАТЕРИАЛАМ

Исходное сырье и материалы, используемые в производстве ЛС, должны соответствовать требованиям нормативных правовых актов Российской Федерации, предъявляемым к животным, пригодным в пищу человека или ветеринарно-санитарным правилам Российской Федерации, касающимся субпродуктов животного происхождения, не предназначенных для употребления в пищу человеком. До и после забоя животных сырье и материалы должны выдерживать проверку, за исключением материалов, полученных от живых животных, которые признаны здоровыми по результатам клинического обследования. Производитель лекарственного средства должен проводить проверку поставщика биологических материалов для подтверждения, что сырье получено и обрабатывается в соответствии с ветеринарно-санитарными нормами системы контроля качества Российской Федерации.

В качестве источника материалов рекомендуется использовать молодых животных, поскольку инфекционная активность при ТГЭ у крупного рогатого скота нарастает в инкубационный период, длящийся несколько лет.

1. Крупный рогатый скот (КРС)

Всемирная организация по охране здоровья животных установила критерии риска страны по губчатой энцефалопатии крупного рогатого скота

(ГЭ КРС). Согласно Международному Кодексу Здоровья Животных ВОЗ страны или регионы классифицируются на следующие категории риска ГЭ КРС:

- Категория «А» - страны и регионы с незначительным риском ГЭ КРС;

- Категория «В» - страны и регионы с контролируемым риском ГЭ КРС;

- Категория «С» - страны или регионы с неопределённым риском ГЭ КРС.

Безопасными источниками сырья для производства ЛС являются страны и регионы категории «А», в которых не зарегистрировано случаев ТГЭ и присутствует обязательное уведомление о подозрительных случаях с клинико-лабораторным расследованием. В случае если для животных и материалов отсутствует указание на категорию «А», возможно использование животных и материалов из стран категории «В». В некоторых случаях, при условии применения обязательных требований, животные могут происходить из стран категории «В» или стран категории «С». Для использования животных, происходящих из стран категории «С», должны быть всегда представлены соответствующие обоснования.

Оценку риска исходных материалов, полученных от животных из изолированных стад КРС, при невозможности определения степени снижения географического риска ГЭ КРС следует рассматривать с учетом категории страны.

2. Мелкие жвачные животные (овцы и козы)

Во многих странах мира в природе зарегистрированы клинические случаи заболевания мелких жвачных животных скрейпи. При этом ГЭ КРС у овец и коз может быть ошибочно диагностирована как скрейпи, поэтому при оценке материалов, полученных от мелких жвачных животных, следует учитывать заболеваемость животных в стране как ГЭ КРС, так и скреипи, а также тип тканей, из которых получены материалы.

Материал от мелких жвачных животных должен быть получен из стран с многолетним статусом отсутствия скрейпи. В случае происхождения материала

из других стран необходимо соответствующее обоснование и меры предосторожности.

Статус «свободного от ТГЭ стада» может быть присвоен стаду овец только с генотипом, обуславливающим резистентность к возбудителям ГЭ КРС или скрейпи. Необходимо учитывать возможность того, что устойчивые к скрейпи генотипы могут быть чувствительны к ГЭ КРС (экспериментальное воздействие через прием внутрь) или атипичной скрейпи (естественные условия). В настоящее время данные о наличии генотипной определенной чувствительности коз к возбудителям ГЭ КРС отсутствуют.

3. Банки клеточных линий, посевные материалы банков клеток, исходные материалы и реактивы, полученные от животных и человека

Банки клеточных линий, посевные материалы, исходный материал или реактивы биологического происхождения, используемые при получении банков клеток или посевных материалов, применяемые при производстве ЛС, должны быть оценены на риск передачи возбудителей ТГЭ.

Следует учитывать, что возможен риск передачи ТГЭ банкам клеточных линий и посевным материалам, которые используются:

- для производства вакцинных антигенов;

- для производства биотехнологических лекарственных средств (моноклональных антител, эритропоэтинов и др.);

- в процессе производства для получения действующего или вспомогательного компонента зарегистрированного лекарственного средства.

Использование материалов или реактивов, полученных от видов животных, подверженных ТГЭ, должно быть подтверждено документально, что риск передачи ТГЭ минимизирован (ветеринарные свидетельства и сертификаты о пригодности сырья, материалов, реактивов; исходные материалы должны быть получены из надежно наблюдаемых стад в странах-поставщиках).

ОЦЕНКА РИСКОВ ПЕРЕДАЧИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ТГЭ ЖИВОТНЫХ

Для снижения риска передачи возбудителей губчатой энцефалопатии животных при производстве ЛС следует использовать материалы синтетического происхождения либо полученные из видов животных, не подверженных ТГЭ. В случае, использования материалов не синтетического происхождения, а из «видов животных, подверженных ТГЭ» должны быть представлены обоснования и приняты необходимые меры по снижению риска передачи ТГЭ.

Источниками/причинами передачи возбудителей ТГЭ животных являются:

- исходное сырье и материалы, действующие и вспомогательные вещества, реактивы, используемые в производстве (бычий сывороточный альбумин; ферменты; питательные среды, в том числе среды для создания банка клеток), инфицированные ТГЭ;

- лекарственный препарат, полученный из тканей, органов, желез животных и человека, инфицированных ТГЭ;

- трансплантируемый орган человека (твердая мозговая оболочка, роговица) или тканевые экстракты, используемые при гормонотерапии от доноров, находящихся в инкубационном периоде болезни Крейцфельда-Якоба;

- инструменты, загрязненные ТГЭ, использованные при диагностике/манипуляциях (электроды для стереоэлектроэнцефалографии), хирургических операциях на головном мозге или при трансплантации твёрдой оболочки мозга или роговицы человека;

- пища и пищевые добавки, содержащие мясо или костную муку, полученные из животных, больных ТГЭ;

- биологические материалы, используемые от видов, поражаемых болезнями ТГЭ для производства лекарственных средств;

- экспериментально перенесенный трансгенными мышами и яванскими макаками (макаки-крабоеды) экспрессирующий человеческий прионный протеин;

- банки клеточных линий, инфицированные возбудителями ТГЭ;

- зараженные материалы, непосредственно контактирующие с лекарственным средством или оборудованием, используемым для производства лекарственного средства, вследствие чего возможна контаминация продукта.

При выборе исходных материалов из видов животных, подверженных ТГЭ, необходимо учитывать классификацию факторов инфекционной активности ТГЭ, связанных с различными типами ткани и органов КРС и мелких жвачных животных, имеющих различный уровень инфекционности (табл. 1).

Таблица 1 – Основные категории органов и тканей животных отношении инфекционной активности ТГЭ

Категория органов и тканей животных в отношении инфекционной активности ТГЭ	Инфекционная активность	Ткани и органы животных по отношению к риску инфицирования ТГЭ	
Категория А	Высокая инфекционная активность	Ткани центральной нервной системы (ЦНС), в которых обнаруживаются высокие инфекционные титры на более поздних стадиях ТГЭ, и некоторые органы и ткани, которые анатомически связаны с ЦНС	- мозг - сетчатка глаза - зрительный нерв - твердая мозговая оболочка
Категория В	Более низкая инфекционная активность	Периферические ткани и органы, результаты исследования, которых подтвердили наличие инфекционной активности одной из форм ТГЭ	- печень - почки - язык - кровь - сердце - желудок (сычуг)
Категория С	Без обнаруженной инфекционной активности	Ткани и органы, результаты исследований, которых по наличию инфекционной активности были отрицательными	- кожа - жировая ткань - молоко

Исходя из патогенеза ТГЭ и эпизоотологического статуса страны, региона происхождения или нахождения животного, следует использовать определенные ткани жвачных, учитывая риски инфекционной активности ТГЭ.

Необходимо учитывать, что перекрестная контаминация тканей различных категорий инфекционности возможна при контакте материала низкой группы риска с материалом высокой группы риска. Она может увеличиваться, если зараженные животные забиваются проникающим оглушением мозга или если головной мозг и/или спинной мозг разрезаются.

Риск перекрестной контаминации снижается, если:

- кровь плода собирают без контаминации другими тканями матери или плода, в том числе плацентой, амниотическими и аллантоисными жидкостями;

- жидкости собирают с минимальными повреждениями тканей, клеточные компоненты удаляются.

Оценка общего снижения потенциального риска лекарственных средств в отношении ТГЭ должна проводиться с учетом мер по контролю источника сырья/исходных материалов и производственного процесса. Материал особого риска следует удалять (например, путем стерилизации) или уничтожать способом, который позволяет избежать любой риск для здоровья людей или животных. Не рекомендуются способы убоя, представляющие риск контаминации головным мозгом других тканей, в странах или регионах кроме тех, которые представляют самую низкую опасность заражения ГЭ КРС. Ткани с высокой инфекционной активностью (ткани категории «А») и вещества, полученные из них, не должны использоваться в производстве ЛС, исходных материалов для них и полупродуктов (включая действующие и вспомогательные вещества и реактивы), если иное не разрешено обоснованием необходимости использования исключительно данных материалов. Вещества, производимые из материалов категории «А», если их использование обосновано, должны быть получены от животных из стран с незначительным риском ГЭ КРС (категория «А»).

Использование тканей с высокой инфекционной активностью (категории «А») в производстве действующих веществ может быть разрешено при предоставлении заявителем положительной оценки соотношения польза/риск, основанной на результате оценки риска и предполагаемых показаниях к применению ЛП:

- путь введения ЛП;
- количество материала животного происхождения, включенного в состав ЛП;
- максимальная терапевтическая доза (суточная доза и продолжительность лечения);
- показания к применению ЛП и его клиническая эффективность;
- наличие видового барьера.

ОСОБЕННОСТИ ПРОИЗВОДСТВА

Контроль производственного процесса ЛС, полученных из тканей или секретов животных должен осуществляться в рамках соответствующей системы обеспечения качества GMP. При производстве должны выполняться процедуры, обеспечивающие прослеживаемость материалов, проведение внутренних аудитов и аудитов поставщиков сырья/исходных материалов. Все принимаемые меры по обеспечению прослеживаемости каждой производственной серии до исходного материала должны быть описаны.

Определенные технологические процедуры могут значительно снизить риск контаминации или исключить риск контаминации ТГЭ. В случае участия в производственном процессе нескольких производственных площадок должны быть четко указаны стадии, выполняемые на каждой площадке.

При наличии в процессе производства ЛС стадии удаления или инактивации возбудителей ТГЭ, представляются соответствующие доказательства адекватности эффективной инактивации возбудителей ТГЭ и материалы по валидации данного процесса. Следует учитывать, что возбудители ТГЭ устойчивы к большинству процедур по инактивации, в то время как риск передачи возбудителей можно уменьшить:

- при тщательном отборе источников животного сырья с официальным подтверждением страны происхождения, категории органов и тканей, возраста животного;

- предупреждением потенциального инфицирования ТЭГ, связанного с производственным процессом и природой материала животного происхождения, используемого в производстве, и выполнением процедур по предупреждению перекрестной контаминации с материалами с более высоким уровнем риска;

- наличие системы обеспечения качества, гарантирующей безопасность готового препарата.

При необходимости процесс производства может включать один или несколько эффективных методов инактивации ТГЭ:

- физический (измельчение, нагревание/давление, осаждение, фильтрация);

- химический (использование кислот, щелочей, сульфата натрия, детергентов или ферментативная обработка),4

- комбинированный (использование кислот, щелочей, детергентов с нагреванием/давлением).

Жесткие процессы химической обработки не всегда могут быть применены к материалам, биологического происхождения. Более приемлемыми методами инактивации являются процессы физического удаления материала богатого прионами, такие как осаждение и фильтрация. Следует учитывать, что инфекционные белки контаминированного биологического материала могут адсорбироваться на поверхности оборудования (как из нержавеющей стали, так и других материалов). При этом процедуру очистки технологического оборудования на способность удаления возбудителей ТГЭ с рабочей поверхности не всегда можно валидировать. В случаях когда оборудование не может быть заменено, адсорбирующие белки удаляют при помощи комбинированной инактивации. На стадиях технологического процесса при использовании разных материалов из категории риска, для минимизации риска

перекрестной контаминации между сериями продукции, вводятся соответствующие процедуры очистки, включая внутрипроизводственный контроль. Это особенно важно, когда материалы с различными категориями риска обрабатываются на одной производственной площадке и на одном и том же оборудовании. Если при производстве продукта используются материалы категории «А», то производство должно осуществляться на оборудовании специального назначения, если иное не разрешено компетентным органом. Для материалов и оборудования, не совместимых с процедурами деконтаминации, рекомендованными ВОЗ, необходимы исследования по разработке и валидации новых процедур снижения риска перекрестной контаминации.

Основными методами выявления патогенной формы прионного белка являются различные варианты иммунологического анализа: иммуногистохимическое исследование (ИГХ), вестерн-блоттинг и иммуноферментный анализ (ИФА). Во всех методиках в качестве объекта исследования используются ткани мозга животных.

ПОЛОЖЕНИЯ ПО ОТДЕЛЬНЫМ МАТЕРИАЛАМ

КОЛЛАГЕН

Коллаген - это фибриллярный белковый компонент соединительной ткани млекопитающих, который получают из костей, шкур и кожи, спилок шкур, связок и сухожилий. Коллаген используется для производства хирургических имплантов.

Для коллагена, полученного из костей, применяют требования, установленные для желатина (см. ниже). Однако в процессе производства коллагена, в отличие от производства желатина, вероятна более низкая возможность инактивации прионов, поэтому источник получения материала является более критичным по риску передачи ТГЭ.

Риск в отношении ТГЭ может быть минимизирован, если при производстве коллагена из шкур, спилок шкур, связок и сухожилий будет исключена возможность контаминации потенциально зараженными материалами (при заготовке должно быть исключено попадание крови и/или

тканей ЦНС).

Исходный материал для человеческих имплантов, произведенных из коллагена, полученного из шкуры, более безопасен, чем из костей, однако не следует исключать возможность перекрестной контаминации, т.е. при убое попадание материала мозга на шкуру животного.

Для поддержки безопасности продукта в процессе производства коллагена присутствует процесс оценки, базирующийся на комбинированных этапах инактивации коллагена. При конечной оценке рисков следует принимать во внимание тот аспект, что коллаген в большинстве случаев используется в форме хирургических имплантов.

ЖЕЛАТИН

Желатин – это природный растворимый белок, гелеобразующий или негелеобразующий, получаемый при частичном гидролизе коллагена, произведенного из костей, шкур и кожи животных. Желатин входит в состав ЛП, применяемых парентерально и для приема внутрь.

Желатин, входящий в состав лекарственных средств, может быть произведен из костей или шкур. Шкуры, при условии предупреждения во время заготовки перекрестной контаминации потенциально зараженными материалами, представляют собой более безопасный исходный материал, чем кости.

При получении желатина из костей должно контролироваться качество исходных материалов и выполняться следующие условия:

1. Черепа и спинной мозг должны быть отделены от собранных костей (исходного материала) независимо от возраста или страны происхождения крупного рогатого скота.

2. Позвоночники должны быть отделены от исходного материала крупного рогатого скота из стран с контролируемым и неопределенным риском ГЭ КРС (страны категорий «B» или «C») в возрасте более 30 месяцев.

3.Желатин для парентерального применения должен производиться из костей животных, полученных из стран с незначительным или контролируемым

риском ГЭ КРС (страны категории «А» или «В», соответственно). Желатин для приема внутрь может производиться из костей животных, полученных из стран с незначительным, контролируемым или неопределенным риском ГЭ КРС (страны категории «А», «В» или «С», соответственно).

При производстве желатина из шкур не требуется особых способов и условий переработки, если выполняются все контрольные операции по предупреждению перекрестной контаминации при заготовке шкуры и в ходе производственного процесса.

Если в качестве исходного материала при производстве желатина используются кости, технология производства является вторым параметром, обеспечивающим безопасность желатина. Желатин может производиться из костей животных, произошедших из стран с незначительным, контролируемым или неопределенным риском ГЭ КРС (категории «А», «В» или «С») и на стадиях технологического процесса используются кислоты, щелочи или нагревание под давлением. Введение в технологический процесс стадий производства – фильтрование, ионообменная хроматография и ультравысокотемпературная стерилизация также повышают степень безопасности желатина.

МАТЕРИАЛЫ ИЗ БЫЧЬЕЙ КРОВИ И ЕЕ КОМПОНЕНТОВ

Эмбриональная (фетальная) бычья сыворотка широко используется при работе с клеточными культурами. Эмбриональную бычью сыворотку получают из плодов, извлеченных на скотобойнях у здоровых коров, пригодных для употребления в пищу человеком, при этом матка должна быть полностью удалена; эмбриональная кровь собирается в закрытую систему для сбора крови в специально предназначенном для этого месте или зоне в асептических условиях путем сердечной пункции.

Сыворотку новорожденного теленка получают у телят в возрасте менее 20 дней. Сыворотку телят получают у животных в возрасте менее 12 месяцев. Донорскую бычью сыворотку получают у животных в возрасте менее

36 месяцев, при этом отрицательный статус стада в отношении ТГЭ должен быть четко определен и зарегистрирован.

Во всех случаях для предупреждения перекрестной контаминации тканями с более высоким риском сыворотка должна быть собрана обученным персоналом согласно определенным процедурам, регламентируемым соответствующими нормативными документами.

С целью подтверждения соответствия бычьей крови и ее компонентов требованиям безопасности должна быть обеспечена прослеживаемость каждой серии сыворотки или плазмы до скотобойни. На скотобойне должны храниться списки ферм, откуда поступили данные животные. Если сыворотка получена у живых животных, для каждой серии сыворотки ведутся записи, обеспечивающие прослеживаемость её происхождения с соответствующей фермы.

В связи с тем, что уровень инфекционной активности ГЭ КРС тканей крупного рогатого скота более высокий, чем в отношении скрейпи, бычья кровь должна быть получена из стран, относящихся к категории А.

Бычья кровь из стран категории В может быть использована при условии подтверждения отсутствия риска перекрестной контаминации крови материалами мозга от убитых животных возрастом более 21 месяца.

Если исходное сырье получают от убитых животных, то учитывают метод оглушения, который играет важную роль в обеспечении безопасности материала (в процессе возможно разрушение и распространение тканей мозга через кровоток). Методы оглушения должны быть обязательно описаны для процесса сбора бычьей крови.

Когда в странах с контролируемым риском ГЭ КРС (категория В) при рутинном забое риск перекрестного заражения крови мозгом не может быть предотвращен, применяются такие меры безопасности, как ограничение возраста скота и/или снижение уровня инфекционных агентов при производстве (табл. 2). В случае когда при производстве крови или ее компонентов, полученных от КРС, не происходит значительного снижения ТГЭ

агентов, для стран с контролируемым риском ГЭ КРС (категория В) должен применяться предупредительный предельный возраст животных не более 21 месяца. Предельный возраст – 30 месяцев считается достаточным для компонентов крови в случае, когда возможно продемонстрировать значительное сокращение ТГЭ агентов, которое можно оценить по снижению/удалению ТГЭ агентов при производственном процессе.

Таблица 2 – Принцип приемлемости бычьей крови/сыворотки и ее компонентов

Название продукта	Географическое происхождение КРС	Возраст КРС	Убой/ перекрестная контаминация крови материалом ЦНС	Демонстрация снижения уровня прионов в процессе производства
Эмбриональная бычья сыворотка	Категория А и В	Нерожденный	Нет риска перекрестной контаминации	Нет
Донорская телячья сыворотка	Категория А и В	< 1 года		
Донорская сыворотка от взрослого быка	Категория А и В[1]	< 36 мес		
Телячья сыворотка	Категория А и В	< 1 года	Риск перекрестной контаминации	Нет
Сыворотка/ плазма от взрослого быка	Категория А	Нет ограничений		
Сыворотка/ плазма/ компоненты сыворотки от взрослого быка	Категория В	< 21 мес[2]		
Компоненты сыворотки от взрослого быка	Категория А	Нет ограничений		
Компоненты сыворотки от взрослого быка	Категория В	< 30 мес		Да[3]

Примечание:

1. При происхождении из стран категории B, скот должен быть из четко определенных и документированных стад.
2. Может допускаться и больший возраст, если перекрестная контаминация крови материалами ЦНС может быть исключена (например, халяль убой).
3. Демонстрация снижения уровня прионов может не потребоваться, если перекрестная контаминация крови материалами ЦНС может быть исключена (например, халяль убой).

Исследования с помощью биохимического анализа могут быть достаточными при наличии научных доказательств того, что этот анализ коррелирует с данными по инфекционности.

МАТЕРИАЛЫ ИЗ ТВЕРДОГО ЖИРА

Твердый жир получают из тканей подкожных, брюшных и межмышечных областей и костей. Твердый жир, используемый в качестве исходного материала для изготовления производных жира, должен быть «материалом категории 3 или аналогичным материалом» согласно ветеринарно-санитарным правилам РФ, касающихся субпродуктов животного происхождения, не предназначенных для употребления в пищу человеком.

Материалы, полученные из твердого жира, такие как глицерин и жирные кислоты, независимо от географического происхождения и природы тканей, из которых они получены, не представляют риск в отношении передачи ТГЭ в случае использования при технологическом процессе жестких условий обработки (таких как гидролиз, омыление, перегонка, воздействие высоких температур под давлением).

Соответствие материалов из твердого жира, произведенных в других условиях, требованиям к снижению риска передачи возбудителей ГЭ животных должно быть подтверждено.

Качество материалов, полученных из твердого жира, но произведенных в других условиях, должно быть подтверждено и соответствовать требованиям к снижению риска передачи возбудителей ГЭ животных.

УГОЛЬ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Уголь животного происхождения получают путем обугливания тканей животных, таких как кости, при температуре более 800 °C. Если иное не

разрешено, исходный материал для производства угля должен быть категории 3 или эквивалентным, согласно ветеринарно-санитарным правилам РФ, касающимся субпродуктов животного происхождения, не предназначенных для употребления в пищу человеком. Независимо от географического происхождения и природы ткани, уголь животного происхождения необходимо оценивать в соответствии с требованиями к снижению риска передачи возбудителей ГЭ животных. Уголь животного происхождения, произведенный при температуре более 800 °С, будет отвечать требованиям к снижению риска передачи возбудителей ГЭ животных.

МОЛОКО И МАТЕРИАЛЫ ИЗ МОЛОКА

Согласно имеющимся научным знаниям вне зависимости от географического происхождения молоко крупного рогатого скота не представляет риска контаминации ТГЭ.

Некоторые материалы, включая лактозу, извлекают из молочной сыворотки или отработанной жидкости после коагуляции в процессе производства сыра. При коагуляции может использоваться ренин теленка, экстракт желудка (сычуг) или ренин, полученный от других жвачных животных.

Риск ТГЭ незначителен, если лактоза и другие материалы из молочной сыворотки, полученной с использованием ренина теленка (в случае если ренин теленка произведен в соответствии с процессом, исключающим перекрестную контаминацию инфекционными агентами при производстве). Материалы из молока крупного рогатого скота, произведенные с выполнением описанных ниже условий, не представляют риска передачи ТГЭ и, следовательно, будут соответствовать требованиям:

- молоко, полученное от здоровых животных в аналогичных условиях, как и молоко, полученное для употребления в пищу человеком;

- при получении материалов (например, панкреатический гидролизат казеина) используется только ренин теленка, материалы от других жвачных животных исключены.

Качество материалов, производных молока, полученных в других условиях, или ренина, полученного от других видов жвачных животных, должно быть подтверждено и соответствовать требованиям к снижению риска передачи возбудителей ГЭ животных.

МАТЕРИАЛЫ ИЗ ШЕРСТИ

Материалы, такие как ланолин и спирты шерстяного воска, полученные из шерсти и волос живых жвачных животных, должны соответствовать требованиям по снижению риска передачи возбудителей ГЭ животных.

Материалы из шерсти и волос убитых жвачных животных, предназначенных для употребления в пищу, соответствуют требованиям к снижению риска передачи возбудителей ГЭ животных, если получены с использованием в технологическом процессе условий регулирования pH, температуры и продолжительной обработки, или соответствуют одному из условий:

- стадия промывки шерсти при органическо-щелочной обработке;

- стадия молекулярной дистилляции проводится при высокой температуре под пониженным давлением.

Соответствие требованиям к снижению риска передачи возбудителей ГЭ животных материалов из шерсти, полученных в других условиях, должно быть подтверждено.

АМИНОКИСЛОТЫ

Аминокислоты могут быть получены путем гидролиза материалов из различных источников.

Если не указано иное, исходный материал для получения аминокислот должен быть категории 3 или эквивалентным, согласно ветеринарно-санитарным правилам РФ, касающимся субпродуктов животного происхождения, не предназначенных для употребления в пищу человеком.

Аминокислоты, полученные из шкур и кожи, не представляют риска передачи ТГЭ, если их производство включает следующие стадии технологического процесса:

- обработка исходных материалов кислыми и щелочными растворами с последующей термообработкой под давлением;

- полученные аминокислоты или пептиды отфильтровывают после обработки;

- анализ чистоты проводится с помощью валидированной и чувствительной методики, позволяющей оценить содержание всех остаточных негидролизованных макромолекул в установленных допустимых пределах.

Соответствие требованиям к снижению риска передачи возбудителей ГЭ животных аминокислот, полученных из других материалов и в других условиях, должно быть подтверждено.

ПЕПТОНЫ

Пептоны – это частичные гидролизаты белка, полученные при ферментативном или кислотном расщеплении. Они используются в микробиологических питательных средах для полноценного питания микроорганизмов, которые могут быть использованы в качестве посевного материала или в промышленном масштабе ферментации для производства человеческих и ветеринарных лекарственных препаратов, в том числе вакцин. Риск передачи возбудителей ГЭ животных может быть снижен в случае:

- если в качестве источника белка используется желатин, отвечающий требованиям раздела «Желатин»;

- если в качестве источника белка используется казеин, отвечающий требованиям раздела «Молоко и материалы из молока»;

- если в качестве источника белка используются ткани видов животных, подверженных ТГЭ, то их получают от животных, пригодных для употребления в пищу;

- если КРС из стран с контролируемым риском ГЭ КРС (категория В), то животные должны быть в возрасте не более 30 месяцев;

- происхождения КРС из стран с незначительным риском ГЭ КРС (категория А) возраст животных не имеет значения.

Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств	**ОФС.1.1.0025.18** **Вводится впервые**

Настоящая общая фармакопейная статья устанавливает общие требования к упаковке, маркировке и транспортированию (перевозке) фармацевтических субстанций, лекарственных препаратов для медицинского применения и вспомогательных веществ.

Требования данной статьи не распространяются на лекарственное растительное сырье и лекарственные растительные препараты.

Основные термины и определения

Упаковка – средство или комплекс средств, совместно обеспечивающих защиту и сохранность лекарственных средств от повреждений и потерь, а также окружающей среды от загрязнений в процессе обращения (транспортирования, хранения и реализации) лекарственных средств.

В зависимости от непосредственного контакта с лекарственным средством различают первичную и вторичную упаковку.

Маркировка – информация в виде надписей, знаков, символов, пиктограмм, цифровых, цветовых и условных обозначений, наносимая на упаковку, и/или этикетку, сопроводительные документы для обеспечения идентификации, информирования потребителей, способах обращения с упакованной продукцией при транспортировании и хранении, для ускорения обработки информации при погрузочно-разгрузочных работах.

Транспортирование (перевозка) – процесс перемещения лекарственных средств от производителя до конечного потребителя

(медицинского учреждения или конкретного пациента), выполняемый организациями, осуществляющими фармацевтическую деятельность, с использованием транспортных средств, обеспечивающих сохранность лекарственных средств от повреждений и потерь, окружающей среды от загрязнений. Транспортирование является составной частью процесса обращения лекарственных средств.

Примечание. Другие термины и определения, используемые в настоящей ОФС, нашли отражение в ОФС «Отбор проб».

Классификация упаковки

К комплексу средств, образующих упаковку лекарственных средств, относят тару, укупорочные средства, средства дозирования, средства доставки, вспомогательные упаковочные средства и другие элементы упаковки, регламентированные требованиями фармакопейной статьи или нормативной документации на конкретное лекарственное средство.

По степени защиты

Упаковка может иметь несколько слоев защиты лекарственного средства.

Элементы *первичной (внутренней) упаковки* находятся в непосредственном физическом контакте с лекарственным средством и обеспечивают его защиту от влияния воздействий окружающей среды в процессе обращения лекарственного средства. В некоторых случаях первичная упаковка представляет собой специализированную систему доставки лекарственного средства, например, аэрозоль или дозирующее устройство, отрегулированное на отпуск одной дозы лекарственного средства.

Элементы *вторичной (внешней) упаковки* не вступают в прямой контакт с лекарственным средством, но обеспечивают необходимую защиту в целях сохранения стабильности. Вторичная упаковка содержит одну или несколько единиц первичной упаковки, в установленных случаях может содержать средства дозирования и средства доставки лекарственного

препарата к месту назначения (мерные ложки, стаканчики, насадки и пр.) и дополнительные элементы упаковки (нож для вскрытия ампул и пр.).

Вторичная упаковка, содержащая необходимую информацию для применения по назначению, как правило, является *потребительской упаковкой.*

С целью дополнительной защиты лекарственного препарата или, исходя из особенностей его применения, первичная упаковка может быть помещена в *промежуточную упаковку.*

Лекарственные средства во вторичной (потребительской) упаковке могут быть помещены в *групповую (объединенную) упаковку*, представляющую собой, как правило, картонные коробки или стопы, с последующим обертыванием стоп бумагой, термоусадочной пленкой в соответствии с указаниями фармакопейной статьи или нормативной документации. При необходимости групповая упаковка может быть склеена или обвязана с использованием вспомогательных упаковочных и обвязочных средств, обеспечивающих прочность упаковки.

В случае реализации лекарственных препаратов только в лечебно-профилактические учреждения допускается использование упаковки *«для стационаров»,* объединяющей установленное количество лекарственных препаратов в первичной упаковке, помещенных в групповую упаковку в соответствии с указаниями фармакопейной статьи или нормативной документации.

Каждая *упаковочная единица* любого вида групповой упаковки должна быть снабжена этикеткой или оклеена бандерольной лентой с нанесенной на нее маркировкой. При склеивании или обвязывании групповой упаковки концы обвязки должны быть заклеены этикеткой, обеспечивающей контроль вскрытия.

При транспортировании лекарственных средств, находящихся в потребительской или групповой упаковке, их помещают в *транспортную упаковку,* предназначенную для хранения и транспортирования

лекарственных средств с целью защиты их от повреждений при перемещении. В установленных случаях допускается транспортировать лекарственные средства в групповой упаковке в *грузовых контейнерах* без укладки в транспортную упаковку.

По защите от вскрытия

Упаковка с защитой от несанкционированного вскрытия (упаковка с контролем первого вскрытия) - упаковка, предусматривающая невозможность использования ее содержимого без очевидного нарушения специального элемента упаковки, необратимо изменяющегося при первом вскрытии, что позволяет отслеживать признаки любого нарушения целостности упаковки.

Упаковка с защитой от вскрытия детьми – упаковка, труднодоступная для вскрытия маленькими детьми, но возможная к использованию взрослыми людьми.

По защите от факторов внешнего воздействия

Хорошо укупоренная упаковка – упаковка, обеспечивающая защиту содержимого от попадания извне посторонних твердых, жидких и газообразных веществ, и/или потери содержимого при обычных условиях хранения, транспортирования и реализации.

Примечание. Для данного контекста обычными считаются условия хранения в проветриваемом помещении при относительной влажности не более 60 ± 5 % и температуре 15-20 °С или, в зависимости от климатической зоны, до 30 °С, при исключении посторонних запахов, источников загрязнения и интенсивного освещения.

Плотно укупоренная упаковка – упаковка, обеспечивающая защиту содержимого от попадания извне посторонних твердых, жидких и газообразных веществ, и/или потери содержимого, выветривания, расплывания или испарения при обычных условиях хранения, транспортирования и реализации.

Герметично укупоренная упаковка – упаковка, обеспечивающая защиту содержимого от попадания извне посторонних веществ, и/или потери

содержимого, обеспечивающая непроницаемость для твердых, жидких и газообразных веществ при обычных условиях хранения, транспортирования и реализации.

Если указана плотно укупоренная упаковка, ее можно заменить герметично укупоренной упаковкой, но не наоборот.

Герметично запаянная упаковка – упаковка, обеспечивающая герметичность с помощью расплавления материала упаковки.

Воздухонепроницаемая упаковка – плотно укупоренная упаковка, обеспечивающая непроницаемость для воздуха, газов, паров и других газообразных веществ при обычных условиях хранения, транспортирования и реализации.

Влагонепроницаемая упаковка – плотно укупоренная упаковка, обеспечивающая непроницаемость для воды, влаги и других жидких веществ при обычных условиях хранения, транспортирования и реализации.

Если указана «воздухо»- или «влагонепроницаемая» упаковка, ее можно заменить на «герметично укупоренную».

Светозащитная упаковка – упаковка, обеспечивающая защиту содержимого от действия световой энергии за счет особенных свойств используемого упаковочного материла или за счет специального покрытия упаковки. Светонепроницаемость упаковки также можно обеспечить, помещая светопроницаемую упаковку внутрь подходящего светозащитного материала.

Изотермическая упаковка- упаковка, внутри которой сохраняется заданная температура в течение установленного времени.

Вакуумная упаковка – упаковка, внутреннее давление в которой ниже атмосферного.

По количеству использований и количеству доз

Одноразовая упаковка - упаковка, содержащая лекарственное средство в количестве, предназначенном для полного использования непосредственно после вскрытия упаковки.

Многоразовая упаковка - упаковка, содержащая лекарственное средство в количестве, которое предполагается использовать многократно по частям, последовательно отбирая содержащееся в ней лекарственное средство без изменения безопасности, качества или чистоты оставшейся части лекарственного средства до его полного использования.

Однодозовая упаковка – упаковка, содержащая лекарственный препарат в твердой, мягкой или жидкой лекарственной форме в количестве, соответствующем одной дозе.

Многодозовая упаковка – упаковка, содержащая лекарственный препарат в количестве, соответствующем более одной дозы лекарственного препарата.

Многодозовая упаковка может быть дозированной (содержимое упаковки распределено на дозы) и недозированной.

Многодозовая недозированная упаковка представляет собой многоразовую упаковку.

Комплект упаковки – потребительская (вторичная, внешняя) упаковка, содержащая первичные упаковки с лекарственным препаратом и растворителем (разбавителем).

Набор – потребительская (вторичная, внешняя) упаковка, содержащая два и/или более комплектов с лекарственными препаратами.

По типу и виду

Классификационная единица, характеризующая упаковку по материалу и конструкции, определяет тип упаковки. Классификационная единица, характеризующая упаковку по форме, определяет вид упаковки.

Ампула – первичная упаковка из медицинского бесцветного или светозащитного стекла или полимерного материала, имеющая цилиндрический корпус с вытянутой горловиной, герметично запаиваемой после наполнения лекарственным средством, с плоским или выпуклым (вогнутым) дном, открываемая исключительно путем разламывания. Содержимое предназначено для однократного применения.

Баллон – упаковка, имеющая корпус каплеобразной, шарообразной или цилиндрической формы, со сферическим или вогнутым дном, с узкой горловиной.

Примечание. Стеклянный баллон допускается называть бутылью.

Баллон аэрозольный (аэрозольная упаковка) –- герметично закрытая первичная упаковка из стекла, полимерных материалов или металла, имеющая корпус цилиндрической формы с узкой горловиной, укупориваемая с помощью клапанно-распылительной системы (дозирующей или недозирующей), внутри которой сохраняется заданное давление, позволяющее проводить распыление.

*Баллон газовый – у*паковка из металла, обычно цилиндрической формы, предназначенная для сжатого, сжиженного или растворенного газа, снабженная устройством, регулирующим спонтанный выход газа при атмосферном давлении и комнатной температуре.

Банка – первичная упаковка из медицинского бесцветного или светозащитного стекла или из полимерного материала, имеющая корпус преимущественно цилиндрической или другой формы с горловиной, диаметр которой равен диаметру корпуса или меньше его, с плоским или вогнутым дном.

Барабан – упаковка из полимерного материала, металла или фибрового картона, имеющая корпус цилиндрической формы без обручей или зигов катания, с плоским дном и съемной или несъемной крышкой.

Примечание. Бочки не классифицируются как барабан.

Бочка – транспортная упаковка, имеющая корпус цилиндрической или параболической формы, с обручами или зигами катания с двумя плоскими торцами (доньями) равного диаметра.

Бутылка – первичная упаковка из медицинского бесцветного или светозащитного стекла или из полимерного материала, имеющая преимущественно цилиндрический корпус разнообразной формы, переходящий в узкую горловину, с плоским или вогнутым дном.

Бутыль – упаковка из медицинского бесцветного или светозащитного стекла или из полимерного материала с цилиндрическим корпусом, переходящим в более или менее выраженную узкую горловину, с плоским или вогнутым дном вместимостью свыше 3000 мл.

Инъекционный шприц – первичная упаковка из медицинского стекла или полимерных материалов цилиндрической формы с канюлеобразным носиком, без или с фиксированной иглой, подвижным поршнем со штоком, с защитным колпачком, обычно используемая для введения парентеральных лекарственных форм. Инъекционный шприц с лекарственным средством представляет собой предварительно наполненный шприц.

Канистра – упаковка из полимерного материала или металла с корпусом, имеющим в сечении, параллельном дну, форму, близкую к прямоугольной или многоугольной, с приспособлением для переноса, сливной горловиной и крышкой с затвором.

Примечание. Сливное отверстие и устройство для переноса обычно располагаются в верхней части корпуса или сбоку.

Картридж – первичная упаковка из медицинского стекла или полимерных материалов, обычно цилиндрической формы, подходящая для жидких или твердых дозированных лекарственных форм; предназначенная, главным образом, для использования в специально сконструированных аппаратах (например, шприц-ручках).

Контейнер (грузовой контейнер) - единица транспортного оборудования многократного применения, предназначенная для перевозки и временного хранения грузов без промежуточных перегрузок, удобная для механизированной загрузки и разгрузки, погрузки и выгрузки, внутренним объемом, равным 1 $м^3$ и более.

Контейнер полимерный для крови и ее компонентов однократного применения – упаковка, представляющая собой замкнутую эластичную, герметичную, стерильную систему однократного применения, предназначенную для взятия крови, разделения ее на компоненты, хранения,

транспортирования и переливания крови и ее компонентов; состоящая из основной емкости для крови и дополнительных емкостей для компонентов крови и соединительных трубок. Контейнер полимерный для крови и ее компонентов однократного применения состоит из основной емкости для крови и дополнительных емкостей для компонентов крови и соединительных трубок. Каждая емкость упаковки имеет штуцеры с внутренним мембранным клапаном, основная емкость имеет узел взятия крови. Различают упаковку, содержащую и не содержащую антикоагулянт и/или раствор консерванта, а также одно, -двух, -трех и четырехкамерную упаковку.

Контурная безъячейковая упаковка (стрип) - гибкая упаковка из комбинированных материалов с лекарственным средством, запечатанным между двумя слоями упаковки, из которых лекарственное средство извлекается путем ее разрыва.

Контурная ячейковая упаковка (блистер) - гибкая упаковка из комбинированных материалов, состоящая из двух слоев, один из которых представляет собой термоформованные ячейки, повторяющие форму упаковываемого лекарственного препарата, который извлекается путем выдавливания или вскрытия.

Коробка – упаковка из картона или полимерного материала, имеющая корпус разнообразной формы с плоским дном, закрываемая клапанами или крышкой съемной, или на шарнире, или крышкой в форме обечайки.

Примечание. 1. Коробку, выполненную из одной заготовки, закрываемую клапанами, допускается называть *пачкой.*

2. Коробку, закрываемую крышкой в форме обечайки, допускается называть *пеналом.*

Мешок – транспортная мягкая упаковка, имеющая корпус в форме рукава с дном и открытым верхом (горловиной) или закрытым верхом с клапаном.

Пакет – упаковка, произведенная на основе бумаги, фольги, полимерного материала, имеющая корпус в виде рукава с дном и открытым верхом, преимущественно гибкая, состоящая из поверхностей, без или с плоским дном, закрываемая на дне или по сторонам методом склеивания,

термосваривания или сшивания; верх может быть закрыт путем сплавления материалов, в зависимости от предназначения.

Примечание: Пакет небольшой емкости допускается называть *пакетиком, саше.*

Пробирка – первичная упаковка из медицинского бесцветного стекла, полимерного материала или металла (алюминия) с цилиндрическим корпусом, с плоским или выпуклым дном, с горловиной, диаметр которой равен диаметру корпуса, укупориваемая пробкой или крышкой, вместимостью до 5 мл.

Стопа – групповая упаковка, представляющая собой наложенные одна на другую, как правило, плоские, одинаковые по размеру, потребительские упаковки, например, пачки.

Туба – первичная упаковка, изготовленная из гибких металлических, полимерных или комбинированных материалов, имеющая корпус преимущественно цилиндрической формы с узкой горловиной, укупориваемой колпачком (бушоном), и дном, закрываемым после наполнения лекарственным средством. Извлечение лекарственного средства осуществляется через горловину путем сдавливания упаковки.

Тюбик-капельница – первичная упаковка из эластичного полимерного материала с клапаном или винтовой горловиной, с защитным колпачком, обеспечивающая принудительное истечение находящегося в ней лекарственного средства (жидкости) через каплеобразователь при надавливании на корпус упаковки.

Флакон – первичная упаковка из медицинского бесцветного или светозащитного стекла или полимерного материала, имеющая корпус разнообразной формы, резко переходящий в горловину, диаметр венчика которой значительно меньше диаметра корпуса, с плоским или вогнутым дном.

Флакон-капельница – система упаковки, представляющая собой флакон из медицинского бесцветного или светозащитного стекла или полимерного

материала, с винтовой горловиной, укомплектованный навинчиваемой крышкой и пробкой-капельницей, обеспечивающей свободное или принудительное истечение жидких лекарственных средств с заданной скоростью.

Флакон из трубки стеклянной (дрота) – первичная упаковка, представляющая собой флакон с гладкой горловиной и прямоугольным венчиком, предназначенный для укупоривания пробкой и алюминиевым закатываемым или обжимным колпачком, вместимостью от 5 до 30 мл. Содержимое парентеральных лекарственных препаратов из флакона, укупоренного резиновой пробкой, извлекается путем прокалывания пробки иглой.

Фляга – транспортная многооборотная упаковка, предназначенная для многократного применения, имеющая цилиндрический корпус и широкую цилиндрическую горловину, диаметр которой меньше диаметра корпуса, с приспособлением для переноса и крышкой с затвором.

Шприц-тюбик – первичная упаковка из эластичного полимерного материала с нанесенной на горловину резьбой и инъекционной иглой с защитным колпачком, обеспечивающая принудительное истечение находящегося в ней содержимого (инъекционных растворов) через иглу при сжатии корпуса упаковки.

Ящик – транспортная жесткая упаковка с прямоугольными или многоугольными сторонами, с дном, двумя торцевыми и боковыми стенками, с крышкой или без нее.

Примечание. 1. Ящик без крышки с выступающими или не выступающими угловыми планками высотой не более 130 мм допускается называть *лотком*.

2. Стороны ящика могут содержать отверстия для манипуляции, вентиляции, демонстрации содержимого.

Примечание. Приведенный перечень типов и видов упаковки не является исчерпывающим, он может быть дополнен в соответствии с указаниями действующих нормативных документов.

По механическим свойствам

Жесткая упаковка- упаковка, форма и размеры которой не изменяются при наполнении или удалении содержимого.

Мягкая упаковка- упаковка, форма и размеры которой изменяются при наполнении или удалении содержимого.

Хрупкая упаковка- упаковка, чувствительная к воздействию динамических нагрузок.

Гибкая упаковка- упаковка, изготовленная из легко сгибаемых упаковочных материалов на основе бумаги, фольги, полимеров, картона.

Элементы упаковки

Тара – основной элемент упаковки, предназначенный для размещения лекарственных средств, конструкция которого может предусматривать наличие укупорочных средств для создания герметичности или замкнутого пространства.

Укупорочное средство - изделие, предназначенное для укупоривания упаковки и сохранения ее содержимого.

Укупорочные средства имеют различный вид (форма, внешние очертания) и тип (материал и модель).

Основные виды и типы укупорочных средств:

Пробка – укупорочное средство, вставляемое внутрь горловины тары.

Крышка - укупорочное средство, закрепляемое по всему наружному периметру верха или тары.

Бушон - крышка, навинчиваемая на горловину тубы.

Пробка-крышка - укупорочное средство, состоящее их двух частей – верхней крышки и внутренней пробки.

Колпачок – укупорочное средство, надеваемое или навинчиваемое на венчик горловины тары.

Средство дозирования *(дозатор, дозирующее устройство)*- функциональное устройство для отмеривания (дозирования) заданной массы или объема лекарственного препарата, которое может быть элементом

укупорочного средства (вставки-капельницы, глазные и назальные капельницы и др.) или самостоятельным компонентом упаковки (мерные ложки/ложечки, мерные колпачки/стаканчики, шприцевые дозаторы, пипетки, аппликаторы вагинальные и ректальные и др.).

Градуировка средств дозирования должна быть четкой, нестираемой. Должно быть гарантировано соответствие рекомендованной к приему дозы лекарственного препарата той дозе, которая будет отмерена с помощью дозирующего устройства упаковки и доставлена пациенту.

Насадка-дозатор – укупорочное средство, часть которого вдавливается внутрь горловины упаковки (тары) и при надавливании на эластичный корпус этой упаковки (тары) обеспечивает принудительное истечение жидкого лекарственного средства дозами.

Дозатор-ограничитель – функциональное устройство упаковки, предназначенное для отмеривания жидкого лекарственного средства по объему и препятствующее или затрудняющее повторное заполнение упаковки.

Средство доставки лекарственного препарата – функциональное устройство, элемент упаковки (укупорочного средства), обеспечивающий доставку лекарственного препарата к месту его введения.

Аэрозольный клапан - затвор для аэрозольной упаковки, сохраняющий давление внутри упаковки и позволяющий при нажатии проводить распыление упакованной продукции.

Дозирующий клапан для аэрозолей является сложным элементом упаковки, обеспечивающим дозирование и доставку лекарственного препарата к месту его введения.

Защитное приспособление - элемент укупорочного средства, предохраняющий упаковку от несанкционированного вскрытия и обеспечивающий визуальный контроль первого вскрытия.

Защитными приспособлениями упаковки являются: диск выдвижного клапана, предохранительное кольцо, контрольное стопорное кольцо, отрывной поясок, перфорация, мембрана из фольги и т.д.

Этикетка-бандероль – элемент упаковки и маркировки, представляющий собой полосу (ленту) упаковочного материала из бумаги или комбинированных материалов, предназначенную для оклеивания (обандероливания) групповой или потребительской упаковки (коробки) по всему периметру с соединением концов полосы, для обеспечения контроля первого вскрытия и последующего нанесения маркировки на полосу (бандероль).

Герметизирующее приспособление – элемент укупорочного средства, предохраняющий содержимое упаковки от потери и от воздействия внешних климатических факторов (крышки самоуплотняющиеся, крышки с герметизирующими прокладками, крышки со вставкой из силикагеля и др.).

Прокладка уплотнительная - элемент упаковки, представляющий собой плоский или рельефный горизонтальный вкладыш в виде диска или кольца, предназначенный для плотного соединения (герметизации) укупорочного средства с поверхностью тары.

Общие требования к упаковке лекарственных средств

Упаковка лекарственного средства должна быть надлежащего качества.

Упаковка и составляющие упаковку элементы (тара, укупорочные средства и др.), должны быть выполнены в соответствии с требованиями действующих в Российской Федерации стандартов по утвержденным в установленном порядке нормативным документам (и/или чертежам) на упаковку (тару, укупорочные средства и др.) для конкретных видов продукции. Форма (конструкция), размеры, допустимые отклонения от размеров упаковки и составляющих ее элементов, а также регламентируемые показатели качества и безопасности упаковки и элементов упаковки, должны отвечать требованиям действующих стандартов.

Для производства упаковки и составляющих ее элементов должны применяться упаковочные материалы, пригодные для контакта с упаковываемой продукцией, в соответствии с требованиями стандартов и технической документации на конкретные виды упаковки и рекомендациями по использованию определенных видов упаковочных материалов для упаковки лекарственных средств. Упаковочные материалы должны быть нетоксичными, совместимыми с лекарственными средствами, разрешенными Минздравом России к применению в контакте с ними.

Материалы первичной и вторичной упаковки должны быть разрешены для производства данного вида упаковки с учетом пути введения лекарственного препарата. Первичные упаковочные материалы должны быть выпущены с учетом правил надлежащей производственной практики (GMP).

Упаковка должна быть одной и той же для каждой серии упаковываемых лекарственных средств.

Упаковка лекарственных средств должна быть чистой, сухой, без посторонних запахов.

Упаковка должна обеспечить сохранение эффективности, качества и безопасности лекарственного средства на всех этапах его обращения: она не должна приводить к потере лекарственного средства, в том числе, посредством диффузии или проникновения лекарственного средства через нее; быть достаточно прочной, чтобы удерживать содержимое при обычном использовании; не изменяться под действием компонентов лекарственного препарата.

Упаковка должна обладать свойствами, защищающими лекарственное средство от неблагоприятного воздействия факторов внешней среды, способных повлиять на его качество или эффективность, таких как свет, температура, атмосферные газы и пары воздуха (кислород, углерода оксиды, влага и др.), микробиологическое загрязнение, а также препятствовать проницаемости (проникновению) указанных факторов к лекарственному средству через материалы упаковки и укупорочные средства. Упаковка

должна защищать лекарственное средство от физического (механического) повреждения.

Упаковка должна обеспечивать сохранение массы (объема), качества и стабильности лекарственного средства (содержание действующего вещества в пределах, установленных фармакопейной статьей) в течение установленного срока годности в заявленных условиях хранения.

Выбранные вид и тип упаковки не должны взаимодействовать физически или химически с лекарственным средством, находящимся внутри упаковки, так как это может привести к изменению его качества.

Выбранные для упаковки лекарственного препарата укупорочные средства должны быть инертны по отношению к содержимому упаковки, обеспечивать надежность укупорки, не быть причиной нежелательного взаимодействия между содержимым упаковки и внешней средой.

Между элементами первичной упаковки и компонентами лекарственного средства, включающими действующие и вспомогательные вещества, в том числе растворители, используемые в различных лекарственных формах, возможно множество вероятных взаимодействий, включая:

- высвобождение (например, выщелачивание) химических веществ из элементов упаковки;

- высвобождение видимых/невидимых частиц;

- абсорбция или адсорбция компонентов лекарственного средства материалами упаковки и ее элементами;

- химическое взаимодействие между лекарственным средством и элементами упаковки;

- разрушение элементов упаковки при контакте с лекарственным средством;

- влияние производственного процесса (например, стерилизации) на упаковку и т.д.

Упаковка должна обеспечить соблюдение условий хранения лекарственного средства в соответствии с показателем «Хранение» фармакопейной статьи или нормативной документации.

Маркировка, нанесенная на упаковку, должна обеспечить идентификацию лекарственного средства и предоставить установленный нормативными документами объем информации о лекарственном средстве потребителю и специалистам, осуществляющим с ним работу.

Упаковка должна способствовать защите потребителя от подделки, фальсификации, предотвращения вскрытия лекарственного средства до использования, а также обеспечить удобство и безопасность при его использовании.

Дозированная упаковка должна обеспечить дозированное или поштучное извлечение лекарственного средства.

Упаковка должна иметь эстетичный внешний вид, быть удобной для транспортирования и хранения, экономичной и соответствовать современным экологическим нормам, требовать минимальных затрат на утилизацию.

Упаковка, предназначенная для наркотических и психотропных лекарственных средств, радиофармацевтических лекарственных препаратов и некоторых других лекарственных средств, должна соответствовать требованиям, предъявляемым к ней соответствующими Федеральными законами и нормативно-правовыми актами Российской Федерации.

Упаковочные материалы

Упаковочный материал – любой материал, предназначенный для производства упаковки и элементов упаковки лекарственного препарата, фармацевтической субстанции, вспомогательного вещества или промежуточной продукции.

В зависимости от наличия прямого контакта с лекарственным средством (лекарственной формой) упаковочные материалы могут быть первичными и вторичными.

Основным сырьем упаковочных материалов для лекарственных средств являются стекло, полимерные и эластомерные материалы, металл, бумага, картон.

Упаковочные материалы, состоящие из двух и более видов сырья, относят к комбинированным упаковочным материалам.

Стекло

Стекло является первичным упаковочным материалом для производства одного из основных элементов упаковки лекарственных средств - стеклянной тары.

Применяют различные марки стекла медицинского, отличающиеся между собой по химическому составу. Выбор марки стекла зависит от физико-химических свойств, способа применения и других характеристик лекарственного средства и/или лекарственной формы, контактирующих с первичным упаковочным материалом - стеклом.

Для парентеральных лекарственных препаратов обычно используют бесцветное стекло, которое обеспечивает возможность осуществления визуального контроля за содержимым упаковки. Аналогичные рекомендации установлены в отношении первичной упаковки из стекла для порошков для парентерального применения.

Марка стекла медицинского, как правило, указана в фармакопейной статье или нормативной документации на лекарственный препарат.

Стекло марки ХТ и ХТ-1 является химически и термически стойким, используется для производства шприцев. Стекло марки ХТ-1 также может быть использовано для производства бутылок для хранения крови, трансфузионных и инфузионных препаратов и ампул.

Стекло марок НС - это нейтральное стекло. Марки НС-1, НС-1А и НС-3 используют для производства ампул и флаконов, при этом стекло марки НС-3 можно использовать для растворов веществ, подвергающихся гидролизу, окислению и подобным изменениям, в том числе в шприцах, а стекло марки НС-1 – для растворов веществ, менее чувствительных к

щелочам. Бесцветное медицинское стекло марок НС-2 и НС-2А предназначено, как правило, для производства бутылок стеклянных для хранения крови, трансфузионных и инфузионных препаратов и аэрозольных баллонов.

Стекло марки АБ-1 – это ампульное, безборное, щелочное стекло, используемое, в основном, для производства ампул, флаконов.

Стекло марки СНС-1- светозащитное нейтральное стекло для производства ампул для растворов светочувствительных веществ.

Для производства банок и флаконов, используемых в качестве первичной упаковки лекарственных средств, не требующих стерилизации, асептического приготовления и не предназначенных для парентерального применения, используют, как правило, стекло медицинское марок МТО (медицинское тарное обесцвеченное), а для светочувствительных веществ - окрашенное стекло марок ОС, ОС-1 (оранжевое тарное).

Химический состав, физико-химические свойства стекла медицинского должны соответствовать установленным требованиям, перечень и критерии приемлемости которых зависят от марки стекла медицинского (от предполагаемого использования). Для оценки качества медицинского стекла проводят его испытания по таким показателям, как термическая стойкость, коэффициент линейного теплового расширения, плотность, водостойкость, щелочестойкость.

Форма (конструкция), внешний вид, основные параметры и размеры, вместимость, масса, а также другие показатели качества готовой упаковки (элемента упаковки) должны соответствовать требованиям действующих стандартов на этот вид упаковки (элемент упаковки).

Упаковка из светозащитного стекла должна соответствовать установленным требованиям по его светозащитным свойствам.

Полимерные материалы

Полимерные материалы широко применяют в производстве упаковки для лекарственных средств и различных элементов упаковки - тары,

укупорочных средств, средств дозирования и доставки, вспомогательных упаковочных средств и др.

Полимерные материалы могут быть первичными и вторичными упаковочными материалами.

Для лекарственных средств в качестве упаковочных материалов используют только определенные виды и марки полимерных материалов, разрешенных к применению. Для производства упаковки и элементов упаковки используют полипропилен, полиэтилен низкого и высокого давления и их смеси, поливинилхлорид, полиэтилентерефталат, полистирол и другие полимерные материалы.

В состав упаковочных полимерных материалов могут быть включены специальные добавки, состоящие из антиоксидантов, стабилизаторов, пластификаторов, смазывающих веществ, красителей, модификаторов ударной прочности и др.

При выборе подходящего вида и марки полимерного материала, предназначенного для производства упаковки и ее элементов для конкретного лекарственного средства, необходимо иметь информацию о его химическом составе, физико-химических и токсикологических свойствах, чтобы оценить потенциальный риск при использовании в качестве упаковочного материала, особенно первичного.

Первичная полимерная упаковка, как правило, укомплектована полимерными укупорочными средствами, представляющими собой различные конструкции крышек и пробок с дозирующими, герметизирующими и другими устройствами.

Первичная полимерная упаковка для парентеральных растворов представляет собой флакон, бутылку или пакет, помещенный, в установленных случаях, в мешок из пленки полимерной. По сравнению со стеклянной, полимерная упаковка имеет некоторые преимущества: она небьющаяся, гибкая и легкая, что особенно важно в случае выбора упаковки для парентеральных растворов. Вместе с тем, при выборе упаковки для

парентеральных растворов следует учитывать свойство полупроницаемости полимерных упаковочных материалов.

Полимерная упаковка и элементы упаковки должны соответствовать требованиям действующих стандартов на этот вид упаковки. Показатели качества и критерии приемлемости установлены в нормативных документах для конкретных видов упаковки в зависимости от ее назначения и характера упаковываемых лекарственных средств.

Эластомерные материалы (резина, силиконовые эластомеры)

Эластомерные материалы используются, в основном, как первичный упаковочный материал для производства укупорочных средств. Они представляют собой сложный многокомпонентный полимерный эластичный материал, включающий эластомерную составляющую и различные добавки.

Основные свойства и характеристики эластомерного материала существенно зависят от состава и типа вулканизации (сшивания) ее базового эластомера, а также от добавок, вводимых для обеспечения заданных свойств (ускорители, наполнители, пластификаторы, мягчители, стабилизаторы, антиоксиданты и др.), которые могут составлять до 50 % эластомерной смеси.

В производстве резиновых пробок, предназначенных для упаковки лекарственных средств, наибольшее использование имеет резиновая смесь на основе бутилкаучуков и галобутилкаучуков (хлор-бутилового и бром-бутилового каучука).

Силиконовый эластомер получают поперечным сшиванием линейного полисилоксана, в качестве обязательной добавки используют кремния диоксид.

Эластомерные укупорочные средства имеют различный тип (конфигурацию, размеры) в зависимости от вида упаковки лекарственного средства, элементом которой они являются.

При выборе марки материала для производства резиновых и силиконовых пробок необходимо учитывать возможность отрицательного

влияния состава эластомерной смеси на эффективность, чистоту, стабильность и безопасность лекарственного средства.

Если резиновые или силиконовые пробки являются элементом первичной упаковки и предназначены для прямого контакта с лекарственным средством, то необходимо иметь информацию о наличии частиц, которые могут попасть в лекарственное средство с поверхности пробок.

В том случае, если они представляют собой элемент первичной упаковки инфузионных растворов в бутылках, флаконах и предназначены для прокалывания металлической инъекционной иглой, то необходимо учитывать такие функциональные параметры пробок как:

-проницаемость - сила, необходимая для прокалывания эластомерной пробки;

-фрагментация - показатель количества эластомерных частиц, образующихся в процессе прокалывания,

-самозакупорка – показатель эффективности повторной закупорки эластомерных пробок после проникновения и удаления иглы,

-целостность закупорки упаковки – показатель эффективности закупорки конкретной системы эластомерная пробка/упаковка.

Резиновые и силиконовые пробки, предназначенные для укупорки лекарственных средств, должны по своим физико-химическим, биологическим и функциональным свойствам соответствовать требованиям действующих стандартов.

Металл

Для производства упаковки и некоторых элементов упаковки лекарственных средств в качестве первичного и вторичного упаковочного материала используют стальные и алюминиевые сплавы металлов.

Алюминий является основным компонентом алюминиевых сплавов, используемых для получения первичной упаковки (баллонов аэрозольных, туб, банок, пробирок и др.), транспортной упаковки (барабанов, бочек, фляг), средств укупорки (колпачков, крышек) и других элементов упаковки.

Алюминиевую фольгу используют в производстве гибкой контурной упаковки, различных герметизирующих и защитных элементов упаковки, а также совместно с бумагой и/или полимерным материалом применяют для производства комбинированной упаковки.

Из стали различных марок, включая нержавеющую сталь, выпускают в основном крупногабаритную упаковку – бочки, фляги и др. Жесть, представляющую собой сплав стали с соответствующим покрытием из металла, используют в основном для производства первичной упаковки - банок металлических, жестяных и крышек для них.

По сравнению с упаковкой из полимерных материалов и стекла, упаковка из металлов является более прочной, непроницаемой для газов, небьющейся, обеспечивает хорошую защиту упаковки от вскрытия.

Соответствующие марки сплавов металлов рекомендованы в качестве первичного упаковочного материала для производства упаковки для лекарственных средств, используемых под давлением в виде аэрозолей, сжиженных газов и др.

Вместе с тем, металл не предназначен для первичной упаковки лекарственных препаратов для парентерального применения.

Колпачки алюминиевые, используемые в качестве укупорочного средства, закатываемого или обжимного на горловине бутылки или флакона после заполнения их лекарственным средством и укупорки резиновыми пробками, обеспечивают герметичность укупорки и контроль первого вскрытия и могут быть выполнены либо из алюминиевой фольги, либо из двух материалов – алюминия и полимерного материала (полипропилена) с добавлением красителей.

Выбор марок металлов для производства упаковки и элементов упаковки, предназначенных для лекарственных средств, осуществляется в соответствии с указаниями действующих стандартов на конкретный вид упаковки.

Выбранные материалы должны обладать физико-механическими свойствами, обеспечивающими устойчивость к воздействию неблагоприятных факторов технологических процессов их производства, транспортирования, хранения и использования. По показателям безопасности материалы должны соответствовать действующим техническим регламентам или санитарным правилам, нормам и гигиеническим нормативам.

Форма, внешний вид, основные параметры и размеры, вместимость, масса, а также другие показатели качества готовой упаковки (элемента упаковки), должны соответствовать требованиям действующих стандартов на этот вид упаковки (элемент упаковки).

Бумага и картон

Бумага используется в качестве первичного и вторичного упаковочного материала для лекарственных средств, а также в качестве вспомогательного упаковочного средства. Картон чаще всего применяют как вторичный упаковочный материал при производстве вторичной (потребительской), групповой или транспортной упаковки (коробок, пачек и др.).

Для производства упаковки применяют определенные марки различных видов бумаги (бумага парафинированная, пергамент растительный и др.) и картона (картон для потребительской тары, картон гофрированный и др.). В качестве вторичных упаковочных средств используют бумагу: этикеточную, писчую, мешочную и др.

Качество бумаги и картона, используемых в производстве упаковки для лекарственных средств, должно соответствовать требованиям действующих стандартов, а показатели качества упаковки, выполненной с использованием этих материалов, должно соответствовать документации на этот вид и тип упаковки, утвержденной в установленном порядке.

Комбинированные упаковочные материалы

Бумага, картон и фольга являются основой для производства комбинированных упаковочных материалов, которые используются в

качестве первичных (гибкие контурные упаковки (блистеры, стрипы), тубы и др.) и вторичных упаковочных материалов (пачки, коробки и др.).

Комбинированный материал на основе бумаги или картона представляет собой двух- или многослойный материал, в котором бумага или картон прочно соединены склеиванием, припрессовкой или иными способами с полимерными пленками, алюминиевой фольгой или другими материалами в различных сочетаниях слоев, с дополнительной поверхностной обработкой слоев или без нее.

Примечание: склеенные слои бумаги и картона не являются комбинированными материалами.

Комбинированные материалы на основе фольги представляют собой трех- или четырехслойный материал, включающий алюминиевую фольгу, полиэтиленовую пленку и бумагу в различных сочетаниях в зависимости от марки материала.

Ламинат - комбинированный упаковочный материал, используемый в производстве туб для лекарственных средств, представляет собой многослойный материал, состоящий из срединного барьерного слоя (алюминиевой фольги или полимерного материала), внешнего и внутреннего слоев из полимерных материалов (полиэтилен) и двух адгезионных слоев, которые связывают вместе три основных слоя.

Критерии выбора упаковки

При выборе оптимальной упаковки и ее элементов, включающих упаковочные материалы, тару, укупорочные средства и др., для конкретного лекарственного средства, необходимо учитывать:

-назначение упаковки (первичная, вторичная (потребительская), групповая и т.д.);

-предназначение упаковываемого лекарственного средства и его количество;

-свойства фармацевтической субстанции и компонентов лекарственного препарата, включая действующие и вспомогательные вещества, в том числе, растворители,

-свойства лекарственной формы лекарственного препарата;

-совместимость каждого элемента первичной упаковки с компонентами лекарственного средства;

-требуемую степень защиты лекарственного средства от влияния внешних факторов (атмосферных, микробиологических, физических) на всех этапах обращения, включая хранение, транспортирование и реализацию;

-защитные характеристики упаковочных материалов, тары, укупорочных средств, конструкции упаковки и т.п.,

-продолжительность хранения лекарственного средства;

- метод наполнения упаковки;

- способ маркировки лекарственного средства;

-удобство использования упаковки лекарственного препарата для потребителя (количество доз, параметры упаковки, способ открывания/закрывания, разборчивость маркировки, способ дозирования и применения лекарственного препарата).

Выбор упаковки, способной обеспечить требуемую стабильность лекарственного средства в течение определенного периода времени, решается производителем (разработчиком) в процессе исследования стабильности на стадии разработки лекарственного средства.

При выборе упаковки для лекарственных средств необходимо использовать представленные в настоящей ОФС данные о видах и типах упаковки/тары, укупорочных средств, упаковочных материалов и прочих элементов упаковки.

Выбранная упаковка (система упаковки) должна соответствовать требованиям раздела «Общие требования к упаковке» настоящей ОФС в течение всего заявленного срока годности лекарственного средства.

Содержимое упаковки может быть предназначено для последующего производства/изготовления лекарственных средств (фармацевтическая субстанция, вспомогательное вещество), для окончательной фасовки и последующей маркировки (нерасфасованные лекарственные средства), для распределения медицинским персоналом по назначению стационарным больным (упаковки «для стационаров»), для индивидуального приема пациентом.

Упаковка лекарственных препаратов*, изготовленных аптечными организациями,* должна соответствовать правилам изготовления и отпуска лекарственных препаратов, утвержденным уполномоченным федеральным органом исполнительной власти.

Упаковка лекарственных средств*, предназначенных для экспорта,* должна соответствовать требованиям договора (контракта) поставщика с внешнеэкономической организацией или иностранным покупателем.

При выборе упаковки для лекарственных средств и вспомогательных веществ, обладающих опасными свойствами (огнеопасные, взрывоопасные, радиофармацевтические, едкие, коррозионные, газы сжатые и сжиженные и др.) следует руководствоваться требованиями фармакопейной статьи или нормативной документации и соответствующих Федеральных законов и нормативно-правовых актов Российской Федерации.

Лекарственные средства, содержащие *летучие, выветривающиеся, гигроскопические или окисляющиеся вещества*, должны быть упакованы в банки или флаконы, укупоренные навинчивающимися крышками в комплекте с пробками или прокладками с уплотнительными элементами; пробками с уплотнительными элементами; закатываемыми металлическими колпачками в комплекте с пробками или прокладками с уплотнительными элементами, закатываемыми металлическими крышками.

Каждое лекарственное средство, содержащее летучее вещество или обладающее запахом, должно быть упаковано отдельно от прочих лекарственных средств.

Лекарственные средства, чувствительные к воздействию света, должны быть упакованы в светонепроницаемую тару.

В качестве первичной упаковки для *фармацевтических субстанций и вспомогательных веществ* рекомендованы банки, бутыли из медицинского бесцветного и светозащитного стекла или банки и канистры из полимерных материалов, пакеты и мешки из полимерных, комбинированных материалов или бумаги, бидоны металлические, баллоны газовые и т.п. В случае необходимости использования емкостей больших объемов для хранения и транспортирования отдельных фармацевтических субстанций (например, спирта этилового) выбор материала первичной упаковки, способной обеспечить требуемую стабильность фармацевтической субстанции в течение определенного периода времени, решается производителем (разработчиком) на стадии разработки лекарственного средства.

Вторичной упаковкой являются барабаны, бочки, ящики, коробки, полимерные ведра и другая упаковка. Выбор групповой и транспортной упаковки осуществляется в соответствии с требованиями фармакопейной статьи или нормативной документации на лекарственное средство, при этом групповая упаковка для фармацевтических субстанций и вспомогательных веществ может отсутствовать.

При выборе упаковки для фармацевтических субстанций, предназначенных для производства/изготовления стерильных лекарственных препаратов, необходимо обеспечить их максимальную защиту от микробиологического загрязнения, в установленных случаях – обеспечить стерильность.

Для фармацевтических субстанций используют, как правило, плотно-укупоренную или герметично-укупоренную, при необходимости дополнительно, светонепроницаемую, упаковку. Для вспомогательных веществ, обычно имеющих крупно-объемную (крупногабаритную) фасовку, подходящей по умолчанию является плотно-укупоренная упаковка.

Масса (объем) упаковки фармацевтической субстанции, поступающей в обращение, должна соответствовать требованиям, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации (показатель «Упаковка»).

При выборе первичной и вторичной (потребительской) упаковки *лекарственного препарата* и оценке удобства ее использования потребителем, необходимо учитывать, что дозированная упаковка гарантирует более безопасное применение лекарственного препарата, уменьшает вероятность ошибки при применении, то есть является более практичной для пациента. Одноразовая упаковка также может быть полезна для лекарственных препаратов, имеющих ограниченный срок годности.

Укупорочные средства должны способствовать быстрому и безопасному использованию лекарственных препаратов. Они могут быть удаляемыми или не удаляемыми. Тип упаковки, который не требует удаления укупорочного средства во время применения, является более предпочтительным, так как такая упаковка минимизирует риск микробиологического и иного загрязнения и/или фальсификации лекарственного препарата.

Упаковка может иметь повторно закрывающееся укупорочное средство или представлять собой упаковку без возможности повторного закрытия - укупоренная методом запаивания, склеивания, термосваривания и т.д.

При выборе упаковки *лекарственного препарата* необходимо учитывать свойства ***лекарственной формы,*** в виде которой он будет использоваться, его агрегатное состояние, способ применения, условия производства/изготовления, количество доз и другие характеристики.

Особенности упаковки твердых лекарственных форм (таблетки, драже, капсулы, гранулы, порошки. Для твердых лекарственных форм первичной многодозовой упаковкой являются банки, флаконы, пробирки из медицинского бесцветного или светозащитного стекла, полимерного

материала или металла, укупоренные пробками, крышками, колпачками, имеющими, как правило, уплотнители-амортизаторы.

Первичной многодозовой упаковкой, имеющей перфорации или ячейки для вмещения индивидуальных доз твердых лекарственных форм, являются контурные упаковки – стрипы и блистеры, изготовленные из фольги алюминиевой, комбинированных материалов на основе фольги, бумаги, полимерных материалов, укупоренные методом термосваривания.

В качестве первичной однодозовой упаковки для порошков и гранул, как правило, используют пакетики, саше из комбинированных материалов на основе бумаги, алюминиевой фольги полимерных материалов, укупоренных методом термосваривания.

Упаковка твердых лекарственных форм должна быть хорошо укупоренной, обеспечивающей защиту от микробиологического загрязнения и от того вида атмосферного фактора, к которому чувствительно содержащееся в упаковке лекарственное средство.

Чувствительные к действию влаги шипучие твердые лекарственные формы (таблетки, гранулы, порошки) должны храниться в плотно укупоренной упаковке, обеспечивающей защиту от проникновения влаги. Упаковка таких лекарственных форм может содержать влагопоглощающие агенты, например, силикагель.

Если в состав гранул и других твердых лекарственных форм входят летучие вещества или вещества, требующие защиты от воздействия воздуха, то упаковка должна быть воздухонепроницаемой.

Таблетки, содержащие эфирные масла и упаковываемые в пробирки, должны быть завернуты в парафинированную бумагу или пергамент.

Капсулы должны быть защищены от воздействия света, избыточной влажности или высушивания и не должны храниться при температуре выше 30 °С.

Вторичной (потребительской) упаковкой для твердых лекарственных форм является, как правило, пакет, пачка или коробка.

Особенности упаковки мягких лекарственных форм (мази, пасты, линименты, гели, кремы, суппозитории, пластыри). Упаковка мягких лекарственных форм должна быть хорошо укупоренной, обеспечивающей защиту от микробиологического загрязнения и от того вида атмосферного фактора, к которому чувствительно содержащееся в упаковке лекарственное средство.

Первичной многодозовой упаковкой для мягких лекарственных форм наиболее часто являются тубы из гибких материалов – металла (алюминия), полимерных или комбинированных материалов, укупоренные бушонами, крышками, колпачками из полимерных материалов; реже используют банки из стекла медицинского бесцветного или светозащитного, укупоренные пластмассовой крышкой с прокладкой или без прокладки.

При использовании туб предпочтительно использование металлических туб с внутренним лаковым покрытием или туб из полимерных материалов с защитной мембраной и латексным кольцом.

Использование туб для упаковки мягких лекарственных форм обеспечивает защиту лекарственного препарата от микробного загрязнения при его использовании, возможность снабжения упаковки средством доставки к месту нанесения лекарственного препарата, защитным приспособлением и др.

Упаковка стерильных мягких лекарственных форм должна быть герметично укупоренной и обязательно иметь защитное приспособление для контроля первого вскрытия.

Упаковка мягких лекарственных форм, предназначенных для назального, ушного, вагинального или ректального использования может иметь дополнительное устройство для введения лекарственного препарата или укомплектована соответствующим аппликатором.

Первичная упаковка суппозиториев представляет собой ячейковую или безъячейковую контурную упаковку или ячейковую контурную упаковку с

открытым хвостиком из комбинированных материалов с различными покрытиями и разными размерами, укупоренную методом термосваривания.

Первичной упаковкой для пластырей, включая лейкопластыри, могут быть безъячейковые контурные упаковки различных размеров, а также укупоренные соответствующим образом пачки, пакеты с клапаном, банки из полимерных материалов. Каждый трансдермальный и медицинский пластырь должен быть помещен в индивидуальную первичную упаковку.

Тубы, банки и контурные упаковки с мягкими лекарственными формами помещают, как правило, во вторичную (потребительскую) упаковку, представляющую собой пачку или коробку.

Особенности упаковки жидких нестерильных лекарственных форм (растворы, сиропы, капли, суспензии, эмульсии). Первичная упаковка жидких нестерильных лекарственных форм наиболее часто является многодозовой и представляет собой различного объема и дизайна флаконы из бесцветного или светозащитного стекла или полимерного материала, укупоренные средствами (крышками, пробками и др.), имеющими и/или не имеющими защиту от несанкционированного вскрытия, а также устройство с защитой от вскрытия детьми.

Элементом укупорочного средства многодозовой упаковки жидких лекарственных препаратов, предназначенных для внутреннего применения, является дозирующее устройство для отмеривания, в том числе каплями, предписанной дозы лекарственного препарата. Дозирующее устройство также может быть самостоятельным элементом упаковки - мерная ложка, мерный стаканчик, пипетка и др.

Первичная упаковка суспензий и эмульсий для внутреннего применения может быть однодозовой, снабженной при необходимости приспособлением, обеспечивающим удобство применения лекарственного средства, а также устройством с защитой от вскрытия детьми.

Флаконы с жидкими нестерильными лекарственными формами помещают, как правило, во вторичную (потребительскую) упаковку, представляющую собой пачку или коробку.

Особенности упаковки газообразных лекарственных форм (аэрозоли, спреи, лекарственные формы для ингаляций). Первичная упаковка для газообразных лекарственных форм может представлять аэрозольный баллон металлический или стеклянный с защитным полимерным покрытием, для спреев - это также может быть флакон из полимерных материалов. Укупорочным средством и одновременно средством доставки и дозирования лекарственного препарата из аэрозольного баллона служит нажимной (распылительный) клапан, который может быть как непрерывного действия, так и дозирующий. В систему упаковки также входит предохранительный колпачок, в некоторых случаях – распылительная насадка (распылитель).

Системы распыления и дозирования аэрозолей и спреев могут быть различных типов и видов, например, флакон может быть укупорен обжимным микроспеером с дозатором и распылительной насадкой с направляющей трубкой и др. устройствами.

Упаковка лекарственных форм для ингаляций включает дозирующее устройство и может быть многодозовой или однодозовой.

Упаковка для дозированных порошков для ингаляций представляет собой индивидуальные ингаляторы: капсульные (спинхалер, ротахалер, дискхалер), резервуарные (турбухалер, циклохалер, изихалер), мультидозированные (мультидиск), − обеспечивающие дозирование и введение (доставку) действующего вещества в дыхательные пути.

Многодозовые упаковки лекарственных форм для ингаляций снабжены дозирующим устройством, за исключением лекарственных форм, предназначенных для распыления с помощью небулайзеров.

Первичная упаковка газообразных лекарственных форм после ее наполнения должна обеспечить отсутствие утечек лекарственного препарата.

Вторичной (потребительской) упаковкой газообразных лекарственных форм являются пачки из картона.

Особенности упаковки стерильных лекарственных форм (парентеральные, глазные лекарственные формы). Выбор упаковки стерильных лекарственных форм зависит от технологии производства лекарственного препарата, его назначения и других факторов.

В соответствии с технологическим процессом стерильные лекарственные формы могут быть подвергнуты финишной стерилизации, получены в условиях асептического производства, произведены по технологии «выдувание-наполнение-стерилизация» и др.

Упаковка лекарственных препаратов, подвергаемых финишной стерилизации, должна позволять стерилизовать лекарственные препараты, как минимум, одним из указанных в ОФС «Стерилизация» методом.

Для *лекарственных средств для парентерального применения* используют различные типы и виды первичной упаковки:

- запаянные ампулы различной конфигурации из стекла и полимерного материала;

- флаконы из дрота или стекломассы, укупоренные резиновыми пробками, обжатые колпачками;

- бутылки для крови, трансфузионных и инфузионных препаратов из стекла, укупоренные резиновыми пробками, обкатанные алюминиевыми колпачками, или двумя колпачками, или с алюминиевой прокладкой и двумя алюминиевыми колпачками;

- бутылки (флаконы) из полимерного материала, герметично запаянные;

- пакеты (мешки) из полимерного материала, герметично запаянные;

- приц-тюбики;

- предварительно наполненные шприцы;

- картриджи и др.

Упаковка лекарственных средств для парентерального применения

может быть однодозовой (ампулы, картриджи, шприц-тюбики, предварительно наполненные шприцы, пакеты) или многодозовой (флаконы, бутылки).

Если не указано иначе в фармакопейной статье или нормативной документации, упаковка лекарственных средств для парентерального применения должна быть достаточно прозрачной для проведения визуальной оценки содержимого, за исключением упаковки для имплантатов.

Первичные упаковки лекарственных средств для парентерального применения должны быть укупорены соответствующими способами (запайка; укупорка резиновой или силиконовой пробкой, обжатой колпачком), прошедшими валидацию.

Эластомерные средства укупорки лекарственных средств для парентерального применения могут быть различными по форме, размеру, иметь специальный дизайн, что обусловлено производственными процессами, например, такими как лиофилизация. Резиновые и силиконовые укупорочные средства должны быть достаточно эластичными, прочными, чтобы при прокалывании иглой сохранялась целостность и обеспечивалась герметичность упаковки после извлечения иглы из укупорочного средства.

Система укупоривания первичной упаковки лекарственных средств для парентерального применения резиновыми и силиконовыми пробками считается целостной только после того, как на укупоренной пробкой упаковке (флаконе, бутылке) будет обжат (закатан) колпачок.

Колпачки алюминиевые или полимерные являются контролем первого вскрытия стерильных лекарственных форм.

Потребительской упаковкой лекарственных препаратов для парентерального применения являются коробки (включая коробки с перегородками), пачки; при этом лекарственные препараты в первичной упаковке (ампулы, флаконы, картриджи и др.) предварительно могут быть помещены в промежуточную упаковку (блистеры и др.).

При упаковывании ампул с *хлорэтилом* допускается применять в качестве амортизатора медицинский алигнин.

Упаковка *лекарственных средств для инъекций в* комплекте с растворителем указывается в фармакопейной статье или нормативной документации.

В упаковку с ампулами, не имеющими кольцо излома, должно быть вложено приспособление для вскрытия ампул – нож ампульный, скарификатор и т.п.

Имплантаты и таблетки для имплантации упаковывают в индивидуальные стерильные упаковки.

Для *глазных лекарственных форм используют* однодозовую и многодозовую упаковку с защитой от несанкционированного вскрытия.

Первичная упаковка глазных капель представляет собой стерильные флаконы, флаконы-капельницы, тюбик-капельницы объемом не более 10мл, если в фармакопейной статье или нормативной документации не указано иное. Однодозовая упаковка глазных капель обеспечивает сохранение стерильности содержимого и дозирующего устройства до момента использования.

Первичная упаковка глазных мазей и гелей представляет собой стерильные, сжимаемые тубы со встроенным или приложенным наконечником, содержимое упаковки, если .не указано иначе – не более 10 г.

Объём глазной примочки в многодозовой упаковке должен быть не более 200 мл, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации.

Каждую глазную пленку/имплантат перед помещением в блистеры, пеналы и т.д. упаковывают индивидуально.

Суспензии и эмульсии для парентерального применения, в форме капель глазных или предназначенных для нанесения на поврежденную кожу, выпускают в стерильной воздухонепроницаемой герметичной упаковке.

Для обеспечения требуемой защиты лекарственного средства от влияния внешних факторов, при выборе упаковки необходимо знать и учитывать ***защитные свойства элементов упаковки - упаковочных материалов, укупорочных средств.***

Упаковочные материалы из стекла и металла, комбинированный упаковочный материал на основе алюминиевой фольги защищают содержимое упаковки от улетучивания (испарения, проницаемости), влаго- и газообмена, от проникновения микроорганизмов извне.

Полимерные материалы и комбинированные материалы на основе бумаги и картона обеспечивают защиту содержимого упаковки от проникновения атмосферной микрофлоры; степень защиты лекарственных средств от улетучивания, влаго-, паро- и газопроницаемость этих материалов зависят как от вида применяемого упаковочного материала, так и от свойств действующих и вспомогательных веществ, входящих в состав лекарственного препарата, от требований к стабильности и сроку годности лекарственного средства, от условий его хранения.

Паро- и газопроницаемость полимерных материалов необходимо учитывать при выборе оптимальной упаковки для лекарственных препаратов, подлежащих стерилизации, в связи с тем, что упаковки из отдельных марок полимерных материалов являются полупроницаемыми.

В наименьшей степени от взаимодействия лекарственного средства с атмосферной средой защищает упаковка из бумаги и картона.

Защиту лекарственного средства от светового потока обеспечивает упаковка из оранжевого светозащитного стекла, из металла, из алюминиевой фольги, из полимерных материалов, окрашенных или замутненных титана диоксидом. Упаковку особо чувствительных к свету фармацевтических субстанций (серебра нитрат, прозерин) из светозащитного стекла рекомендуется оклеивать черной светонепроницаемой бумагой.

Применение упаковки из картона, бумаги для обеспечения защиты лекарственного средства от воздействия светового излучения, возможно при

подтверждении светозащитных свойств в соответствующей области спектра используемых марок упаковочных материалов из картона и бумаги.

Если при хранении и транспортировании лекарственного средства допускается воздействие низкой температуры, то при выборе упаковочного материала необходимо учитывать риск повреждения упаковки и потери содержимого при замерзании последнего.

Защитные свойства тем выше, чем толще материал (стенки) упаковки и чем выше герметичность укупоривания упаковки.

Материал резиновых пробок способен обеспечить защиту от воздействия света, проникновения микроорганизмов, улетучивания (испарения, проницаемости); степень защиты от газопроницаемости зависит от физико-химических свойств резинового материала, состава и свойств лекарственного средства, его количества, температуры.

На защитную функцию упаковки оказывает влияние соблюдение правил GMP при производстве упаковки.

Общие требования к маркировке лекарственных средств

Маркировка лекарственных средств должна соответствовать требованиям Федеральных законов и нормативно- правовых актов Российской Федерации.

Маркировка лекарственных препаратов, изготовленных аптечными организациями (экстемпоральных лекарственных препаратов) осуществляется в соответствии с правилами изготовления и отпуска лекарственных препаратов, утвержденными уполномоченным федеральным органом исполнительной власти.

Маркировка может представлять собой надписи, нанесенные непосредственно на упаковку или на этикетку, прикрепляемую на упаковку.

Способ нанесения маркировки должен обеспечить сохранность маркировки в течение всего срока годности лекарственного средства при соблюдении установленных условий хранения.

Содержание маркировки лекарственного средства и оформление надписей на потребительской и групповой упаковке (этикетке упаковок) должно быть указано в фармакопейной статье или нормативной документации.

Маркировка лекарственного средства должна быть нанесена хорошо читаемым шрифтом на русском языке, при этом надписи, знаки, символы должны быть контрастными фону, на который нанесена маркировка.

Маркировка и оформление упаковки должны быть едиными для каждой серии упакованных лекарственных средств.

Каждая единица потребительской и групповой упаковки должна быть снабжена этикеткой, инструкцией по применению (или листком-вкладышем) в соответствии с требованиями фармакопейной статьи или нормативной документации на конкретное лекарственное средство.

Если размеры потребительской упаковки допускают, то содержание листка-вкладыша или инструкции по применению может быть нанесено на упаковку.

На первичной и вторичной (потребительской) упаковке лекарственного препарата указывается:

- наименование лекарственного препарата (международное непатентованное или группировочное или химическое, или торговое наименование),
- номер серии;
- дата выпуска (для иммунобиологических лекарственных препаратов);
- срок годности;
- дозировка или концентрация;
- объем;
- активность в единицах действия или количество доз.

Дополнительно на вторичной (потребительской) упаковке лекарственного препарата необходимо указывать:

- торговое наименование лекарственного препарата;

- наименование производителя лекарственного препарата;

- номер регистрационного удостоверения;

- способ применения;

- лекарственную форму;

- условия отпуска;

- условия хранения;

- предупредительные надписи;

- штриховой код.

На первичной упаковке фармацевтических субстанций указывается:

- наименование фармацевтической субстанции (международное непатентованное или группировочное или химическое);

- торговое наименование фармацевтической субстанции;

- наименование производителя фармацевтической субстанции;

- номер серии и дата производства/изготовления;

- количество в упаковке и единицы измерения количества;

- срок годности;

- условия хранения.

Маркировка лекарственных средств должна содержать следующие обязательные надписи и надписи информационного характера:

- «Хранить в недоступном для детей месте»,

- стерильные лекарственные средства должны иметь надпись «Стерильно»,

- лекарственные средства в качестве сывороток должны иметь указание животного, из крови, плазмы крови, органов и тканей которого они получены,

- вторичная (потребительская) упаковка лекарственных средств, полученных из крови, плазмы крови, органов и тканей человека, должна иметь надпись: "Антитела к ВИЧ-1, ВИЧ-2, к вирусу гепатита С и поверхностный антиген вируса гепатита В отсутствуют",

- вторичная (потребительская) упаковка гомеопатических лекарственных препаратов должна иметь надпись: «гомеопатический»,

- на первичную и вторичную (потребительскую) упаковку радиофармацевтических лекарственных средств должен наноситься знак радиационной опасности.

При необходимости на упаковку наносятся другие предупредительные надписи и символы.

Маркировка лекарственных средств не должна содержать информацию рекламного характера.

Упаковка лекарственных средств, *предназначенных исключительно для экспорта*, маркируется в соответствии с требованиями страны-импортера.

На транспортной упаковке лекарственных средств указывается:

- наименование лекарственного средства;

- серия лекарственного средства;

- дата выпуска;

- количество вторичных (потребительских) упаковок лекарственного средства;

- наименование производителя лекарственного средства, его местонахождение (адрес, в том числе страна и (или) место производства лекарственного средства);

- срок годности;

- условия хранения и транспортирования (перевозки).

На транспортную упаковку должны быть нанесены предупредительные надписи и манипуляционные знаки, указывающие на способы обращения с грузом.

Транспортная маркировка опасных грузов должна соответствовать действующим требованиям.

Требования к изложению текстов маркировки должны соответствовать указанным в действующих нормативно-правовых документах Российской Федерации.

Общие требования к транспортированию лекарственных средств

Транспортирование (перевозка) лекарственных средств осуществляется всеми видами транспорта (автомобильным, железнодорожным, авиационным, морским, речным) в закрытых транспортных средствах, соблюдая правила перевозки грузов, установленные для соответствующего вида транспорта.

Лекарственные средства, подлежащие транспортированию, должны быть помещены в контейнер (грузовой) или другую, регламентированную действующими стандартами, транспортную упаковку.

Транспортирование лекарственных средств необходимо осуществлять в условиях, обеспечивающих:

- возможность их идентификации;

- предотвращение взаимодействия транспортируемых лекарственных средств и загрязнения (контаминирования) одних лекарственных средств другими;

- предотвращение повреждений и хищений лекарственных средств;

- защиту от неблагоприятного воздействия факторов внешней среды (температура, свет, влажность) и других отрицательных факторов.

Значения климатических факторов внешней среды, влияющих на лекарственные средства при их транспортировании, не должны превышать допустимых значений, установленных действующими правилами.

Транспортирование лекарственных средств в районы Крайнего Севера и приравненные к ним труднодоступные районы проводят в соответствии с действующими правилами.

При транспортировании лекарственных средств, обладающих опасными свойствами (огнеопасные, взрывоопасные, радиофармацевтические, едкие, коррозийные, газы сжатые и сжиженные, ядовитые, инфекционные и др.), необходимо соблюдать требования Федеральных законов и нормативно-правовых актов Российской Федерации, регламентирующих правила транспортирования опасных грузов. При этом групповая и транспортная

упаковка должны соответствовать классу опасности и иметь маркировку с указанием знака опасности.

Транспортное средство, предназначенное для перевозки лекарственных средств, обладающих опасными свойствами, должно быть оснащено дополнительным оборудованием согласно предписанию.

Особые условия должны быть созданы при транспортировании (перевозке) термолабильных и скоропортящихся лекарственных средств.

Температурный режим при транспортировании термолабильных лекарственных средств должен соответствовать законодательным требованиям, требованиям фармакопейной статьи или нормативной документации таким образом, чтобы изменение температурного диапазона выше или ниже уровня, не влияло отрицательно на качество лекарственного средства.

При транспортировании термолабильных лекарственных средств транспортные средства должны быть обеспечены приборами, контролирующими и регистрирующими температуру, а также устройствами и оборудованием, обеспечивающими и поддерживающими надлежащий температурный режим.

Транспортирование термолабильных лекарственных средств, включая иммунобиологические лекарственные препараты, осуществляют в специальных транспортных средствах – авторефрижераторах, которые оснащены приборами (термографами и др.), позволяющими получать документальное подтверждение соблюдения температурного режима во время транспортирования. Специальные авторефрижераторы и контрольно-измерительные (регистрационные) приборы, используемые для измерения температурного режима, подлежат поверке в установленном порядке. Изотермические кузова специальных авторефрижераторов подвергают дезинфекционной обработке в установленном порядке.

Транспортирование термолабильных лекарственных средств авторефрижераторным транспортом осуществляется в транспортной

упаковке. Способ размещения транспортной упаковки в кузове специального авторефрижератора должен обеспечивать свободную циркуляцию воздуха и сохранность термолабильных лекарственных средств.

При перевозке в других закрытых транспортных средствах (кроме авторефрижераторов) термолабильные лекарственные средства должны быть помещены в медицинские термоконтейнеры (сумки-холодильники).

Перед транспортированием в термоконтейнеры вместе с термолабильными лекарственными средствами закладывают хладоэлементы. Упаковку термолабильных лекарственных средств в термоконтейнеры осуществляют в помещениях, предназначенных для этих целей. Для обеспечения необходимого температурного режима количество и тип закладываемых в термоконтейнеры хладоэлементов должны соответствовать требованиям документов на используемые термоконтейнеры и хладоэлементы.

Контроль за соблюдением температурного режима при транспортировании, продолжительности нарушения температурного режима (если присутствовало) осуществляют с помощью терморегистраторов (термографов), или термоиндикаторов, помещенных в термоконтейнеры.

Продолжительность транспортирования термоконтейнеров с термолабильными лекарственными средствами не должна превышать времени, в течение которого используемые термоконтейнеры гарантируют поддержание в них требуемого температурного режима.

Совокупность условий, создаваемых при производстве, хранении, транспортировании, использовании термолабильных лекарственных средств, которые обеспечивают требуемый температурный режим от производителя до конечного потребителя, называют холодовой цепью.

Осмолярность **ОФС.1.2.1.0003.15**

Взамен ГФ XII, ч. 1, ОФС 42-0047-07

Осмолярность – это характеристика растворов, выражающая их осмотическое давление через суммарную концентрацию кинетически активных частиц в единице объема раствора (мОсм/л).

Существующие инструментальные методы позволяют определять не осмолярность, а осмоляльность – концентрацию кинетически активных частиц на килограмм растворителя (мОсм/кг).

Кинетически активные частицы – это молекулы, ионы или ионные комплексы одного или нескольких растворенных веществ, свободно распределенные во всем объеме растворителя и обладающие способностью к хаотическому перемещению внутри раствора.

Осмолярность и осмоляльность характеризуют создаваемое растворами осмотическое давление.

Осмолярность является одной из важнейших характеристик инфузионных растворов. На этикетках растворов для инфузий должно быть указано теоретическое значение их осмолярности. В случае, когда теоретическая осмолярность не может быть рассчитана, указывают среднее значение осмоляльности для данного лекарственного средства.

Теоретическая осмолярность может быть рассчитана по формуле:

$$C_{осм} = \frac{m}{M} \cdot n \cdot 1000 \qquad (1)$$

где: $C_{осм}$ – осмолярность раствора, миллиосмоль на литр (мОсм/л);
m – содержание вещества в растворе, г/л;

M – молярная масса вещества, г;

n – суммарное число ионов, образующихся из одной молекулы растворенного вещества в результате диссоциации (n = 1 для недиссоциирующих веществ, n = 2, 3 для веществ, образующих при растворении соответствующее количество ионов).

На практике, количество частиц (n) несколько меньше теоретически рассчитанного и приближенно может быть описано формулой:

$$n = n_o \cdot \varphi \qquad (2),$$

где: n – реальное количество частиц, образующихся при растворении данного вещества;

n_o – теоретически рассчитанное количество частиц (n=1,2,3…);

φ – молярный осмотический коэффициент, учитывающий взаимодействие между частицами в растворе и зависящий только от количества растворенного вещества.

Коэффициент φ определяется экспериментально.

Растворы, равные по осмолярности 0,9 % раствору натрия хлорида, называют изотоническими. Для изотонических растворов теоретически рассчитанные значения осмолярности находятся в пределах 239 – 376 мОсм/л.

Осмолярность растворов, состоящих из нескольких компонентов, может быть определена как сумма осмолярностей всех компонентов.

Концентрацию инфузионных растворов принято выражать как массо-объемную (в *г/л*), поэтому удобным представляется рассчитывать содержание кинетически активных частиц в *миллиосмолях на литр* (осмолярность), а не на *килограмм* (осмоляльность) раствора.

Различиями между значениями осмолярности и осмоляльности растворов с осмолярностью, близкой к осмолярности 0,7-1,1 % раствора натрия хлорида или ниже, можно пренебречь (теоретическое значение осмотического давления 0,9 % раствора натрия хлорида – 308 мОсм/л; экспериментальное значение – 286 мОсм/л); для более концентрированных растворов (например, 10 % раствора натрия хлорида) осмолярность может быть определена по формуле:

$$C(\text{мОсм/л}) = C(\text{мОсм/кг}) \cdot \rho \qquad (3)$$

где: ρ – плотность раствора, кг/л.

Примечания. 1. Расчет теоретических границ осмолярности проводят следующим образом: *минимальное значение* – осмолярность раствора, содержащего минимально допустимые количества ингредиентов; *максимальное значение* – осмолярность раствора, содержащего максимально допустимые количества ингредиентов.

2. При наличии в растворе высокомолекулярного вещества за его молярную массу берется средняя молекулярная масса фракции.

3. Гидрокарбонаты при расчете осмолярности учитываются как соли одноосновной кислоты.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОСМОЛЯЛЬНОСТИ ВОДНЫХ РАСТВОРОВ

Для определения осмоляльности могут быть использованы следующие методы: криоскопический, мембранная и паровая осмометрия.

Криоскопический метод

Метод основан на понижении точки замерзания растворов по сравнению с точкой замерзания чистого растворителя.

1 осмоль на килограмм воды понижает точку замерзания на 1,86 °С. Измерение этих изменений лежит в основе криоскопического метода.

Данная зависимость может быть выражена следующей формулой:

$$C_{осм} = \frac{(T_2 - T_1)}{K} \cdot 1000 \quad (мОсм/кг\ H_2O) \qquad (4)$$

где: $C_{осм}$ – осмоляльность раствора (мОсм/кг)
T_2 – температура замерзания чистого растворителя (˚С);
T_1 – температура замерзания испытуемого раствора (˚С);
K – криометрическая постоянная растворителя (для воды: 1,86).

В настоящее время определение осмоляльности растворов проводится с использованием автоматических криоскопических осмометров.

Необходимое количество испытуемого раствора помещают в ячейку прибора. Далее проводят измерение согласно инструкции, прилагаемой к прибору. При необходимости прибор калибруют с помощью стандартных растворов натрия или калия хлорида, которые перекрывают определяемый диапазон осмоляльности (таблица 1).

Таблица 1 – Стандартные справочные значения понижения температуры замерзания и эффективности осмотической концентрации водных растворов натрия и калия хлоридов

Аналитическая концентрация соли p, г/кг H_2O	Понижение температуры замерзания $\Delta T_{зам.}$, K	Эффективная (осмотическая) концентрация $m_{эф}$, ммоль/кг H_2O
Растворы натрия хлорида		
5,649	0,3348	180
6,290	0,3720	200
9,188	0,5394	290
9,511	0,5580	300
11,13	0,6510	350
12,75	0,7440	400
16,00	0,9300	500
Растворы калия хлорида		
7,253	0,3348	180
8,081	0,3720	200
11,83	0,5394	290
12,25	0,5580	300
14,78	0,6696	360
20,71	0,9300	500

Метод мембранной осмометрии

Метод основан на использовании свойства полупроницаемых мембран избирательно пропускать молекулы веществ.

Движущей силой процесса является процесс осмоса. Растворитель проникает в испытуемый раствор до установления равновесия; возникающее при этом дополнительное гидростатическое давление приближенно равно осмотическому давлению и может быть рассчитано по формуле:

$$\pi_{осм} \approx P_{гидр.} = \rho \cdot g \cdot \Delta h \qquad (5)$$

где: $\pi_{осм}$ – осмотическое давление, Па;
$P_{гидр.}$ – гидростатическое давление, Па;
ρ – плотность жидкости, кг/м^3;
g – ускорение свободного падения, Н/кг;
Δh – высота столба жидкости, м.

Осмоляльность может быть рассчитана по формуле:

$$C_{осм} = \pi_{осм} / R \cdot T \qquad (6)$$

где R – универсальная газовая постоянная (8,314 Дж/мольК)
T – абсолютная температура (˚К).

Примечание. Данный метод применим только для растворов высокомолекулярных веществ (10^4 – 10^6 г/моль). При анализе растворов, содержащих электролиты и другие низкомолекулярные вещества, будет определяться только осмотическое давление, создаваемое высокомолекулярными компонентами раствора.

Определение осмоляльности испытуемого раствора проводят с помощью мембранного осмометра. Предварительную калибровку прибора и измерения проводят в соответствии с инструкцией к прибору.

Метод паровой осмометрии

1 осмоль на килограмм воды понижает давление пара на 0,3 мм рт. ст. при температуре 25 °С. Измерение этих изменений лежит в основе метода паровой осмометрии.

Метод основан на измерении разности температур, которая возникает на термисторах, помещенных в измерительную ячейку, насыщенную парами растворителя в случае, если на один из них нанесена капля чистого растворителя, а на другой – испытуемого раствора. Разница температур возникает по причине конденсации паров растворителя на капле раствора, так как давление пара растворителя над этой поверхностью меньше. При этом температура капли раствора повышается за счет экзотермического процесса конденсации до тех пор, пока давление пара над каплей раствора и давление чистого растворителя в ячейке не сравняются. При нанесении на оба термистора чистого растворителя разность температур равна нулю. Разность температур практически пропорциональна моляльной концентрации раствора.

Определение осмоляльности испытуемого раствора проводят с помощью парового осмометра. Предварительную калибровку прибора и измерения проводят в соответствии с инструкцией к прибору.

Ионометрия **ОФС.1.2.1.0004.15**

Взамен ст. ГФ XI, вып.1

Взамен ГФ XII, ч.1, ОФС42-0048-07

Метод ионометрии основан на измерении активности (концентрации) определяемых ионов с помощью ионоселективных (индикаторных) электродов. Ионоселективный электрод обладает избирательной чувствительностью к определенному виду ионов, от содержания которых зависит его потенциал. В основу ионометрии положен принцип потенциометрического анализа, заключающийся в измерении разности потенциалов (электродвижущей силы) индикаторного ионоселективного электрода и электрода сравнения, потенциал которого постоянен.

Зависимость электродвижущей силы электродной системы от активности потенциалопределяющего иона описывается уравнением Нернста:

$$E = E_o + 2{,}303 \frac{R \cdot T}{z \cdot F} \lg a \qquad (1),$$

где: E – разность потенциалов между измерительным электродом и электродом сравнения (электродвижущей силы), мВ;

E_0 – стандартное значение электродвижущей силы при a=1, мВ;

R – универсальная газовая постоянная, Дж/(моль·К);

T – абсолютная температура, К;

F – число Фарадея, Кл/моль;

z – заряд определяемого иона;

a – активность или эффективная концентрация свободных ионов в растворе, связанная с концентрацией соотношением:

$$a = f \cdot C \qquad (2),$$

где:

C – молярная концентрация, моль/л;

f – коэффициент активности.

Для очень разбавленных растворов коэффициент активности близок к единице и активность ионов равна концентрации.

Если коэффициент активности поддерживается постоянным, уравнение Нернста принимает вид:

$$E = E_0 + \frac{k}{z} \cdot \lg (f \cdot C) \qquad (3), \quad \text{где}$$

$k = 2{,}303\frac{R \cdot T}{F}$ – коэффициент, который означает изменение электродвижущей силы на единицу изменения lg a, и может быть рассчитан по формуле при любой температуре:

$$k = [0{,}05916 + 0{,}000198 \cdot (t - 25^{o}\,C)] \qquad (4)$$

и приведен в табл. 1.

Таблица 1

Значения k при различных температурах

Температура, ^{o}C	k , В
15	0,0572
20	0,0582
25	0,0592
30	0,0602
35	0,0611

Коэффициент активности (f) считается постоянным, если при измерениях во всех анализируемых и калибровочных растворах поддерживается одинаковая ионная сила. Для создания постоянной ионной силы к раствору добавляют раствор индифферентного электролита (фоновый раствор) с концентрацией в 10-100 раз больше, чем суммарная концентрация других ионов в растворе, с тем, чтобы различные количества анализируемого иона не влияли на ионную силу раствора и коэффициент активности определяемого иона оставался постоянным.

Если $E = E_0 + \frac{k}{z} \cdot \lg f = E_o'$ и $S = \frac{k}{z}$,

где: S – крутизна электродной функции, то

$$E = E_o' + S \lg C = E_o' - S \cdot pC \qquad (5),$$

где: $pC = - \lg C$.

Таким образом, при постоянной ионной силе раствора и постоянной температуре наблюдается линейная зависимость электродвижущей силы электродной системы от концентрации определяемого иона.

ИЗМЕРЕНИЕ АКТИВНОСТИ И КОНЦЕНТРАЦИИ ИОНОВ

Ионометрические измерения осуществляют с использованием ионометра (высокоомного вольтметра с входным сопротивлением по крайней мере в 100 раз большим, чем сопротивление используемых электродов), который включает в себя электродную систему и измерительный преобразователь.

В качестве ионоселективных электродов могут использоваться электроды с жидкой (пластифицированные электроды) или с твердой мембраной (монокристаллические, поликристаллические или стеклянные электроды), электроды с заряженными (положительно или отрицательно) или нейтральными подвижными носителями, сенсибилизированные электроды (электроды с ферментативной подложкой, газ-индикаторные электроды). Электродом сравнения служит, главным образом, хлорсеребряный электрод или каломельный электрод с соответствующими индифферентными соединительными жидкостями.

Показания прибора снимают в милливольтах или в единицах pX. Подготовка иономера к работе и проведение измерений производятся согласно инструкциям, прилагаемым к прибору. Измерения выполняют при постоянной температуре ± 0,5 ºС и постоянной ионной силе раствора. Помещают электроды в испытуемый раствор и снимают установившееся показание при медленном и постоянном перемешивании.

При частых измерениях периодически проверяют стабильность отклика и линейность градуировочного графика в диапазоне концентраций испытуемого раствора. В противном случае проверку проводят перед каждым измерением.

1. Метод градуировочного графика

Метод градуировочного графика заключается в построении графика зависимости электродвижущей силы электродной системы от логарифма концентрации стандартных растворов и последующем нахождении концентрации испытуемого раствора по измеренному в нем значению электродвижущей силы электродной системы. Градуировочный (калибровочный) график строится микропроцессором измерительного преобразователя автоматически на основе введенных в него значений электродвижущей силы электродной системы и соответствующих им значений pX при калибровке иономера в стандартных растворах (двух и более). Подбор концентраций стандартных растворов должен соответствовать диапазону концентраций испытуемых растворов: крайние значения концентраций испытуемых растворов должны находиться внутри линейной области калибровочного графика. Значение pX в испытуемом растворе находится автоматически с использованием градуировочного графика по измеренному значению электродвижущей силы электродной системы (E) – рис.1.

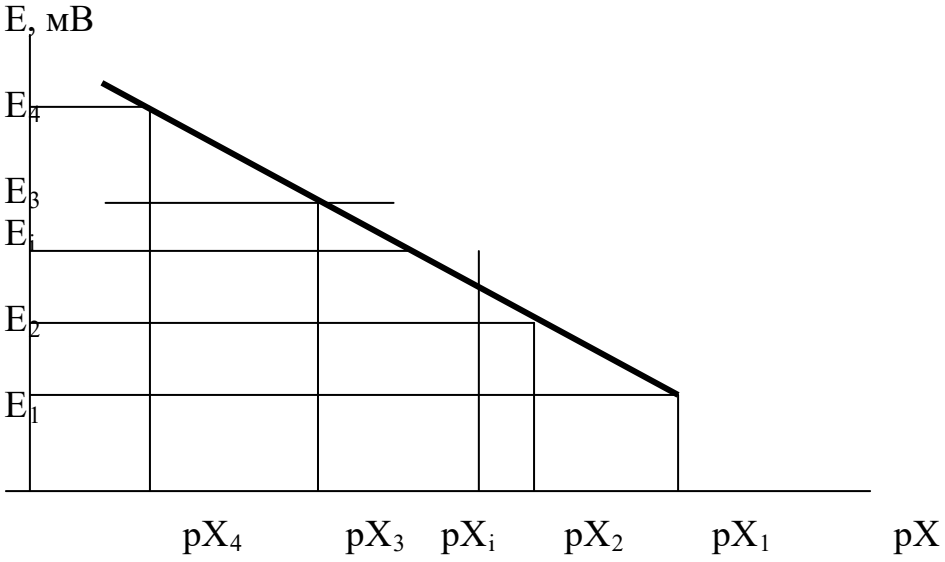


Рисунок 1. Градуировочный график зависимости электродвижущей силы электродной системы от концентрации потенциалопределяющего иона.

Поскольку в разбавленных растворах pX = - lgC, значение молярной концентрации (моль/л) вычисляют по уравнению:

$$C = 10^{-pX} \qquad (6),$$

Значение массовой концентрации иона (г/л) рассчитывают, исходя из уравнения:

$$C = M \cdot 10^{-pX} \qquad (7),$$

где: M – молярная масса иона, г/моль.

При наличии влияния других компонентов испытуемого раствора на потенциал ионоселективного электрода используют метод стандартных добавок.

2. Метод стандартных добавок

Метод применим в линейных областях калибровочной кривой.

2.1. Метод многократных добавок

В испытуемый раствор объемом V, приготовленный, как указано в фармакопейной статье, вводят несколько (не менее трех) порций объемом V_0 ($V_0 \leq 0{,}01*V$) раствора с известной концентрацией определяемого иона, соблюдая условие неизменной ионной силы в растворе. Измеряют потенциал до и после каждой добавки и вычисляют разность ΔE между потенциалом, измеренным после добавки раствора с известной концентрацией, и исходным потенциалом испытуемого раствора. Полученная величина связана с концентрацией определяемого иона уравнением:

$$\Delta E = S \cdot \lg\left(1 + \frac{C_0 \cdot V_0}{C \cdot V}\right), \qquad (8)$$

или

$$10^{\frac{\Delta E}{S}} = 1 + \frac{C_{0.} \cdot V_{0.}}{C \cdot V}, \qquad (9)$$

где: V – объем испытуемого раствора, л;

C – молярная концентрация определяемого иона в испытуемом растворе, моль/л;

$V_{0.}$ – добавленный объем стандартного раствора, л;

$C_{0.}$ – концентрация определяемого иона в стандартном растворе, моль/л;

S – крутизна электродной функции, определяемая экспериментально при постоянной температуре измерением разности потенциалов двух стандартных растворов, концентрации которых отличаются в 10 раз и соответствуют линейной области калибровочной кривой, мВ.

Строят график зависимости $10^{\frac{\Delta E}{S}}$ от объема добавки $V_{0.}$ и экстраполируют полученную прямую до пересечения с осью абсцисс. В точке пересечения концентрация испытуемого раствора определяемого иона выражается уравнением:

$$C = \frac{C_{0.} \cdot V_{0.}}{V} \qquad (10)$$

2.2 Метод однократной добавки

К объему V испытуемого раствора, приготовленного как описано в фармакопейной статье, прибавляют объем $V_{0.}$ стандартного раствора с концентрацией $C_{0.}$. Готовят контрольный раствор в тех же условиях. Измеряют потенциалы испытуемого и контрольного раствора до и после добавления стандартного раствора. Вычисляют концентрацию C анализируемого иона, используя следующее уравнение и делая необходимые поправки на контрольный раствор:

$$C = \frac{C_{0.} \cdot V_{0.}}{10^{\frac{\Delta E}{S}} \cdot (V + V_{0.}) - V} \qquad (11)$$

где: V – объем испытуемого или контрольного раствора, л;

C – концентрация определяемого иона в испытуемом растворе, моль/л;

V_0 – добавленный объем стандартного раствора, л;

C_0 – концентрация определяемого иона в стандартном растворе, моль/л;

ΔE – разность потенциалов, измеренных до и после добавки, мВ;
S – крутизна электродной функции, определяемая экспериментально при постоянной температуре измерением разности потенциалов двух стандартных растворов, концентрации которых отличаются в 10 раз и соответствуют линейной области калибровочной кривой, мВ.

3. Потенциометрическое определение pH

Водородным показателем pH, характеризующим концентрацию ионов водорода в водных растворах, называется отрицательный десятичный логарифм активности ионов водорода

$$pH = - \lg a_{H}^{+} \qquad (12)$$

Потенциометрическое определение pH заключается в измерении электродвижущей силы электродной системы, где в качестве ионоселективного электрода используют чувствительный к ионам водорода электрод (обычно стеклянный), в качестве электрода сравнения – стандартный электрод с известной величиной потенциала (насыщенный каломельный или хлорсеребряный электроды). На практике для измерения pH применяют метод градуировочного графика. pH испытуемого раствора связан с pH стандартного раствора следующим уравнением:

$$pH = pH_S - \frac{E - E_S}{k}, \qquad (13)$$

где: E – потенциал электрода в испытуемом растворе, мВ;
E_S – потенциал того же электрода в растворе с известным значением pH (стандартном растворе), мВ;
k – коэффициент, который означает изменение электродвижущей силы на единицу изменения pH, мВ;
pHs – pH стандартного раствора.

Прибор. В качестве прибора для потенциометрического определения pH используют иономеры или pH-метры с чувствительностью не менее 0,05 единиц pH или 3 мВ. Калибровка приборов производится по стандартным

буферным растворам, приведенным в общей фармакопейной статье «Буферные растворы».

Методика. Все измерения проводят при одной и той же температуре в интервале от 20 до 25 ºС, если нет других указаний в фармакопейной статье. В табл. 2 приведена зависимость значений pH от температуры для различных стандартных буферных растворов, используемых для калибровки прибора. Для приготовления указанных растворов могут быть использованы стандарт-титры для приготовления буферных растворов – рабочих эталонов pH (фиксаналы) промышленного производства.

Таблица 2

pH стандартных буферных растворов при различных температурах

Температура, ºС	0,05 М раствор калия тетраоксалата	Насыщенный при 25ºС раствор калия гидротартрата	0,05М раствор калия дигидроцитрата	0,05М раствор калия гидрофталата	0,025М раствор калия фосфата однозамещенного и 0,025М раствор динатрия гидрофосфата безводного	0,0087М раствор калия фосфата однозамещенного и 0,0303М раствор динатрия гидрофосфата безводного	0,01М раствор натрия тетрабората	0,025М раствор натрия карбоната и 0,025М раствор натрия гидрокарбоната	Насыщенный при 25ºС раствор кальция гтдроксида
15	1,67		3,80	4,00	6,90	7,45	9,28	10,12	12,81
20	1,68		3,79	4,00	6,88	7,43	9,23	10,06	12,63
25	1,68	3,56	3,78	4,01	6,87	7,41	9,18	10,01	12,45
30	1,68	3,55	3,77	4,02	6,85	7,40	9,14	9,97	12,29
35	1,69	3,55	3,76	4,02	6,84	7,39	9,10	9,93	12,29
$\frac{\Delta pH}{\Delta t}$[(1)]	+0,001	-0,0014	-0,0022	+0,0012	-0,0028	-0,0028	-0,0082	-0,0096	-0,034

[(1)] – изменение pH на градус Цельсия.

Если необходимо, учитывают температурные поправки в соответствии с инструкцией предприятия-производителя. Прибор калибруют при помощи буферного раствора калия гидрофталата (первичный стандарт) и одного из буферных растворов с другим значением pH (предпочтительно одного из приведенных в табл. 2). Показания прибора для третьего буферного раствора

с промежуточным значением pH не должны отличаться больше, чем на 0,05 единиц pH от табличного значения pH этого раствора. Электроды прибора погружают в испытуемый раствор и измеряют pH в тех же условиях, что и для буферных растворов.

Все испытуемые растворы и стандартные буферные растворы должны быть приготовлены на воде очищенной, не содержащей углерода диоксид, для чего перед употреблением ее необходимо прокипятить. Вода, не содержащая углерода диоксид, должна иметь pH 5,8 - 7,0.

Приготовление стандартных буферных растворов

0,05 М раствор калия тетраоксалата. 12,61 г $KC_4H_3O_8 \cdot 2H_2O$ растворяют в воде и доводят объем раствора тем же растворителем до 1000,0 мл.

Насыщенный при 25 °С раствор калия гидротартрата. Избыток $KC_4H_5O_6$ энергично встряхивают с водой при температуре 25 °С в течении 30 мин. Фильтруют или декантируют. Раствор используют свежеприготовленным.

0,05 М раствор калия дигидроцитрата. 11,41 г $KC_6H_7O_7$ растворяют в воде и доводят объем раствора тем же растворителем до 1000,0 мл. Раствор используют свежеприготовленным.

0,05 М раствор калия гидрофталата. 10,13 г $KC_8H_5O_4$, предварительно высушенного при температуре от 110 до 135 °С до постоянной массы, растворяют в воде и доводят объем раствора тем же растворителем до 1000,0 мл.

0,025 М раствор калия фосфата однозамещенного и 0,025 М раствор динатрия гидрофосфата безводного. 3,39 г KH_2PO_4 и 3,53 г Na_2HPO_4, предварительно высушенных в течение двух часов при температуре от 110 до 130 °С до постоянной массы, растворяют в воде и доводят объем раствора тем же растворителем до 1000,0 мл.

0,0087 М раствор калия фосфата однозамещенного и 0,0303 М раствор динатрия гидрофосфата безводного. 1,18 г KH_2PO_4 и 4,30 г Na_2HPO_4, предварительно высушенных при температуре от 110 до 130 °С, растворяют в воде и доводят объем раствора тем же растворителем до 1000,0 мл.

0,01 М раствор натрия тетрабората. 3,80 г $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ растворяют в воде и доводят объем раствора тем же растворителем до 1000,0 мл. Хранят, защищая от углерода диоксида.

0,025 М раствор натрия карбоната и 0,025 М раствор натрия гидрокарбоната. 2,64 г Na_2CO_3 и 2,09 г $NaHCO_3$ растворяют в воде и доводят объем раствора тем же растворителем до 1000,0 мл.

При измерении pH в неводных и смешанных растворителях, а также в некоторых коллоидных системах, следует иметь в виду, что полученные значения pH являются условными.

Примечание. Буферные растворы хранят в хорошо закрытых склянках нейтрального стекла в течение 3-х мес. При образовании осадков и видимых изменений буферные растворы не подлежат использованию.

Растворимость **ОФС.1.2.1.0005.15**

Взамен ГФ X

Взамен ГФ XII, ч.1, ОФС 42-0049-07

В фармакопейном анализе понятие растворимости приводится в качестве характеристики приблизительной растворимости фармацевтических субстанций и вспомогательных веществ (далее – веществ) при фиксированной температуре. Испытание, если нет других указаний в фармакопейной статье, следует проводить при температуре (20 ± 2) ºС.

Если растворимость является показателем чистоты вещества, то в фармакопейной статье должны быть представлены конкретные количественные соотношения вещества и растворителей.

Рекомендуется использовать растворители разной полярности (обычно три); не рекомендуется использование легкокипящих и легковоспламеняющихся (например, диэтиловый эфир) или очень токсичных (например, бензол, метиленхлорид) растворителей.

Растворимость вещества (в пересчете на 1 г вещества) выражают в следующих терминах, приведенных в таблице.

Таблица – Обозначения растворимости фармацевтических субстанций и вспомогательных веществ

Термин	**Примерное количество растворителя (мл), необходимое для растворения 1 г вещества**
Очень легко растворим	до 1 включительно
Легко растворим	от 1 до 10 включительно
Растворим	от 10 до 30 включительно
Умеренно растворим	от 30 до100 включительно
Мало растворим	от 100 до 1000 включительно
Очень мало растворим	от 1000 до 10 000 включительно
Практически нерастворим	более 10 000

Вещество считают растворившимся, если в растворе при наблюдении в проходящем свете не обнаруживаются частицы вещества. В растворе могут присутствовать следовые количества физических примесей, например, таких как волокна фильтровальной бумаги. Для веществ, образующих при растворении опалесцирующие растворы, соответствующее указание должно быть приведено в фармакопейной статье.

Термин «смешивается с…» используется для характеристики жидкостей, смешивающихся с указанным растворителем во всех соотношениях.

Если указано, что вещество растворимо в жирных маслах, то имеется в виду, что оно растворимо в любом масле, относящемся к классу жирных масел.

Методика определения растворимости. К навеске растертого в тонкий порошок вещества прибавляют отмеренное количество растворителя и непрерывно встряхивают в течение 10 мин при (20 ± 2) ºС.

Для медленно растворимых веществ, требующих для своего растворения более 10 мин, допускается нагревание на водяной бане до

30 ºС. Наблюдение производят после охлаждения раствора до комнатной температуры и энергичного встряхивания в течение 1 – 2 мин.

Условия растворения медленно растворимых веществ указывают в фармакопейных статьях.

Для веществ с неизвестной растворимостью испытание проводят по следующей методике.

К 1,0 г растертого вещества прибавляют 1,0 мл растворителя и проводят растворение, как описано выше. Если вещество полностью растворилось, оно очень легко растворимо.

Если вещество растворилось не полностью, то к 100 мг растертого вещества прибавляют 1,0 мл растворителя и проводят растворение, как описано выше. Если вещество полностью растворилось, оно легко растворимо.

Если вещество растворилось не полностью, то добавляют 2,0 мл растворителя и продолжают растворение. Если вещество полностью растворилось, оно растворимо.

Если вещество растворилось не полностью, то добавляют 7,0 мл растворителя и продолжают растворение. Если вещество полностью растворилось, оно умеренно растворимо.

Если вещество растворилось не полностью, то к 10 мг растертого вещества прибавляют 10,0 мл растворителя и проводят растворение, как описано выше. Если вещество полностью растворилось, оно мало растворимо.

Если вещество растворилось не полностью, то к 10 мг растертого вещества прибавляют 100 мл растворителя и проводят растворение, как описано выше. Если вещество полностью растворилось, оно очень мало растворимо.

Если вещество не растворилось, оно практически нерастворимо в данном растворителе.

Для веществ с известной растворимостью испытание проводят по

описанной выше методике, но только для крайних значений, относящихся к указанному термину. Например, если вещество растворимо, то 100 мг растертого вещества не должны растворяться в 1,0 мл растворителя, но должны раствориться полностью в 3,0 мл растворителя.

Степень окраски жидкостей **ОФС.1.2.1.0006.15**

Взамен ст. ГФ X

Взамен ст. ГФ XI, вып.1

Взамен ГФ XII, ч.1, ОФС 42-0050-07

Окраску жидкостей определяют визуально одним из методов, приведенных ниже, путем сравнения с соответствующими эталонами. В статью включены методы контроля качества лекарственных средств по показателям «цветность» и «цветность раствора». Цветность является условно принятой количественной характеристикой для жидкостей, имеющих незначительную окраску.

Цвет – это восприятие или субъективная реакция наблюдателя на объективный раздражитель в виде энергии, излучаемой в видимой области спектра и охватывающей диапазон длин волн от 400 до 700 нм. Окраска двух растворов совпадает (при определенном источнике света), если их спектры поглощения и отражения идентичны и наблюдатель не замечает разницы между ними.

Ахроматизм или отсутствие окраски означает отсутствие у испытуемого раствора абсорбции в видимой области спектра.

Для визуальной оценки окраски жидкостей в зависимости от интенсивности в области коричневых, желтых и красных цветов используют один из двух методов, описанных в статье.

Бесцветной считается жидкость, если ее окраска не отличается от воды (в случае растворов – от соответствующего растворителя) или она окрашена не

более интенсивно, чем эталон B_9.

Сравнение степени окраски жидкости с эталонами $(B, BY, Y, GY, R)_{1-3}$ обычно проводят по методу 1; в случае использования эталонов B_{4-9}, $(BY, Y, GY, R)_{4-7}$ применяют метод 2.

Метод 1

Испытания проводят в одинаковых пробирках из бесцветного, прозрачного, нейтрального стекла с внутренним диаметром около 12 мм, используя равные объемы – 2,0 мл испытуемой жидкости и воды, или растворителя, или эталона сравнения, описанного в статье. Сравнивают окраску при рассеянном дневном свете, горизонтально (перпендикулярно оси пробирок) на матово-белом фоне.

Метод 2

Испытания проводят в одинаковых пробирках из бесцветного, прозрачного, нейтрального стекла с внутренним диаметром от 15 до 25 мм, используя равные слои высотой 40 мм испытуемой жидкости и воды, или растворителя, или эталона сравнения, описанного в статье. Сравнивают окраску при рассеянном дневном свете сверху вдоль вертикальной оси пробирок на матово-белом фоне.

Приготовление исходных растворов

Желтый раствор. 46,0 г (точная навеска) железа(III) хлорида ($FeC1_3 \cdot 6\ H_2O$; М.м. 270,30) помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, растворяют в 900 мл смеси, приготовленной из 25 мл концентрированной хлористоводородной кислоты и 975 мл воды, доводят объем раствора этой же смесью до метки и перемешивают. Определяют количественное содержание железа(III) хлорида в 1 мл раствора. Объем раствора железа(III) хлорида разбавляют этой же смесью таким образом, чтобы содержание железа(III) хлорида в 1 мл составляло 45,0 мг.

Раствор хранят в защищенном от света месте.

Количественное определение: 10,0 мл раствора железа(III) хлорида

помещают в коническую колбу с притертой пробкой вместимостью 250 мл, прибавляют 15 мл воды, 5 мл концентрированной хлористоводородной кислоты и 4 г калия йодида, перемешивают, закрывают пробкой и оставляют на 15 мин в темном месте, затем прибавляют 100 мл воды. Титруют выделившийся йод раствором 0,1 М натрия тиосульфата, прибавляя 0,5 мл раствора крахмала 1% в конце титрования в качестве индикатора.

Параллельно проводят контрольный опыт.

1 мл 0,1 М раствора натрия тиосульфата соответствует 27,03 мг железа(III) хлорида ($FeCl_3 \cdot 6\ H_2O$).

Красный раствор. 60,0 г (точная навеска) растертого кобальта хлорида ($CoCl_2 \cdot 6\ H_2O$; М.м. 237,93) помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 900 мл смеси, приготовленной из 25 мл концентрированной хлористоводородной кислоты и 975 мл воды, доводят объем раствора этой же смесью до метки и перемешивают. Определяют количественное содержание кобальта хлорида в 1 мл раствора. Объем раствора кобальта хлорида разбавляют этой же смесью таким образом, чтобы содержание кобальта хлорида в 1 мл раствора составляло 59,5 мг.

Количественное определение. 5,0 мл раствора кобальта хлорида помещают в коническую колбу с притертой стеклянной пробкой вместимостью 250 мл, прибавляют 5 мл 3 % раствора перекиси водорода и 30 мл 10 % раствора натрия гидроксида. Смесь кипятят с обратным холодильником в течение 10 мин, затем охлаждают до комнатной температуры и прибавляют 60 мл 1 М раствора серной кислоты и 2 г калия йодида. Закрывают колбу и растворяют осадок, осторожно помешивая. Выделившийся йод титруют 0,1 М раствором натрия тиосульфата до бледно-розового окрашивания, используя в качестве индикатора 0,5 мл раствора крахмала 1% в конце титрования.

Параллельно проводят контрольный опыт.

1 мл 0,1 М раствора натрия тиосульфата соответствует 23,79 мг кобальта хлорида ($CoCl_2 \cdot 6\ H_2O$).

Голубой раствор. 63,0 г (точная навеска) меди(II) сульфата ($CuSO_4 \cdot 5 H_2O$; М.м. 249,68) помещают в мерную колбу вместимсотю 1000 мл, растворяют в 900 мл смеси, приготовленной из 25 мл концентрированной хлористоводородной кислоты и 975 мл воды, доводят объем раствора этой же смесью до метки и перемешивают. Определяют количественное содержание меди(II) сульфата в 1 мл раствора. Объем раствора меди(II) сульфата разбавляют этой же смесью таким образом, чтобы содержание меди(II) сульфата в 1 мл раствора составляло 62,4 мг.

Количественное определение. 10,0 мл раствора меди(II) сульфата помещают в коническую колбу с притертой стеклянной пробкой вместимостью 250 мл, прибавляют 50 мл воды, 12 мл 2 М раствора уксусной кислоты, 3 г калия йодида и перемешивают. Выделившийся йод титруют 0,1 М раствором натрия тиосульфата до бледно-коричневого окрашивания, используя 0,5 мл раствора крахмала 1% в качестве индикатора в конце титрования.

Параллельно проводят контрольный опыт.

1 мл 0,1 М раствора натрия тиосульфата соответствует 24,97 мг меди(II) сульфата ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$).

Приготовление стандартных растворов

Стандартные растворы получают смешением исходных растворов железа(III) хлорида, кобальта хлорида, меди(II) сульфата с 1% раствором хлористоводородной кислоты, отмеривая их с помощью калиброванной пипетки или бюретки с точностью до 0,02 мл (табл. 1).

Таблица 1 - Стандартные растворы

Стандартные растворы	**Желтый исходный раствор, мл**	**Красный исходный раствор, мл**	**Голубой исходный раствор, мл**	**1 % раствор хлористоводородной кислоты, мл**
B (коричневый)	30,0	30,0	24,0	16,0
BY (коричневато-желтый)	24,0	10,0	4,0	62,0
Y (желтый)	24,0	6,0	0	70,0
GY (зеленовато-желтый)	96,0	2,0	2,0	0
R (красный)	10,0	20,0	0	70,0

Приготовленные исходные и стандартные растворы помещают в сухие колбы с притертыми пробками и хранят при температуре (20±3) °С в защищенном от попадания прямых солнечных лучей месте.

Срок годности исходных и стандартных растворов – 1 год.

При хранении исходных и стандартных растворов следует перед употреблением убедиться в отсутствии в них мути, осадка и хлопьев. При наличии таковых растворы заменяют свежеприготовленными.

Приготовление эталонов

Эталоны готовят из пяти стандартных растворов путем разбавления их 1 % раствором хлористоводородной кислоты.

Отмеривание исходных и стандартных растворов для приготовления шкал производят при помощи калиброванной пипетки или бюретки с точностью до 0,02 мл.

Эталоны для определения степени окраски жидкостей по методу I хранят в ампулах из бесцветного прозрачного нейтрального стекла с наружным диаметром 12 мм, в защищенном от света месте в течение 1 года.

Эталоны, используемые для определения степени окраски жидкостей по методу II, готовят из соответствующих стандартных растворов непосредственно перед использованием.

Количества компонентов для приготовления эталонов цветности приведены в табл. 2-6.

Таблица 2 - Эталоны коричневых оттенков (шкала В)

Эталоны шкалы В	**Стандартный раствор В, мл**	**1 % раствор хлористово-дородной кислоты, мл**
B_1	75,0	25,0
B_2	50,0	50,0
B_3	37,5	62,5
B_4	25,0	75,0
B_5	12,5	87,5
B_6	5,0	95,0
B_7	2,5	97,5
B_8	1,5	98,5
B_9	1,0	99,0

Таблица 3 - Эталоны коричневато-желтых оттенков (шкала BY)

Эталоны шкалы BY	Стандартный раствор BY, мл	1 % раствор хлористо-водородной кислоты, мл
BY_1	100,0	0,0
BY_2	75,0	25,0
BY_3	50,0	50,0
BY_4	25,0	75,0
BY_5	12,5	87,5
BY_6	5,0	95,0
BY_7	2,5	97,5

Таблица 4 - Эталоны желтых оттенков (шкала Y)

Эталоны шкалы Y	Стандартный раствор Y, мл	1 % раствор хлористо-водородной кислоты, мл
Y_1	100,0	0,0
Y_2	75,0	25,0
Y_3	50,0	50,0
Y_4	25,0	75,0
Y_5	12,5	87,5
Y_6	5,0	95,0
Y_7	2,5	97,5

Таблица 5 - Эталоны зеленовато-желтых оттенков (шкала GY)

Эталоны шкалы GY	Стандартный раствор GY, мл	1 % раствор хлористо-водородной кислоты, мл
GY_1	25,0	75,0
GY_2	15,0	85,0
GY_3	8,5	91,5
GY_4	5,0	95,0
GY_5	3,0	97,0
GY_6	1,5	98,5
GY_7	0,75	99,25

Таблица 6 - Эталоны красных оттенков (шкала R)

Эталоны шкалы R	Стандартный раствор R, мл	1 % раствор хлористо-водородной кислоты, мл
R_1	100,0	0,0
R_2	75,0	25,0
R_3	50,0	50,0

R_4	37,5	62,5
R_5	25,0	75,0
R_6	12,5	87,5
R_7	5,0	95,00

Степень окраски испытуемого раствора не должна превышать степень окраски соответствующего эталона. Цвет испытуемого образца должен быть максимально приближен к цвету соответствующего эталона.

При сравнении окраски испытуемого раствора с эталонами указывают номера эталона и букву шкалы. Например, окраска раствора не должна превышать эталон B_7.

При необходимости могут быть использованы другие эталоны, приготовленные путем смешения стандартных растворов разных цветовых шкал с точным указанием их объемов для достижения нужной окраски, приближенной к окраске испытуемого раствора, если это предусмотрено фармакопейной статьей.

Для оценки окраски жидкостей возможно использование спектрофотометрического метода, если это предусмотрено фармакопейной статьей, при этом должны быть указаны: длина волны, при которой наблюдается максимум поглощения в видимой области спектра, толщина кюветы и значение оптической плотности с допустимыми отклонениями.

Прозрачность и степень мутности жидкостей	**ОФС.1.2.1.0007.15** **Взамен ст. ГФ X** **Взамен ст. ГФ XI, вып.1** **Взамен ГФ XII, ч.1, ОФС 42-0051-07**

Прозрачность и степень мутности жидкостей определяют путем сравнения испытуемой жидкости с растворителем или эталонами визуально или инструментальным методом.

Визуальное испытание проводят в одинаковых пробирках с притертой пробкой из прозрачного бесцветного и нейтрального стекла с внутренним диаметром около 15 мм. Для сравнения берут равные объемы эталона и испытуемой жидкости (5 или 10 мл). Испытание проводят при освещении электрической лампой матового стекла мощностью 40 Вт, расположенной над образцом, просматривая растворы перпендикулярно вертикальной оси пробирок на черном фоне через 5 мин после приготовления эталона.

Испытуемую жидкость считают прозрачной, если она по прозрачности не отличается от воды или растворителя, используемого при приготовлении испытуемой жидкости, или ее опалесценция (мутность) не превышает опалесценцию (мутность) эталона I при просмотре в описанных выше условиях.

Эталонами служат взвеси из гидразина сульфата и гексаметилентетрамина.

Приготовление раствора гидразина сульфата. 0,50 г гидразина сульфата помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 40 мл воды, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Раствор выдерживают в течение 4 – 6 ч.

Приготовление раствора гексаметилентетрамина. 3,00 г гексаметилентетрамина растворяют в 30,0 мл воды.

Приготовление исходного эталона. К 25,0 мл раствора гидразина сульфата прибавляют 25,0 мл раствора гексаметилентетрамина, перемешивают и оставляют на 24 ч.

Исходный эталон стабилен в течение 2 мес при хранении в стеклянной посуде, не имеющей дефектов поверхности (взвесь не должна прилипать к стеклу), с притертой пробкой.

Приготовление основного эталона. 15,0 мл исходного эталона помещают в мерную колбу вместимостью 1 л, доводят объем жидкости водой до метки и перемешивают.

Срок годности основного эталона 24 ч.

Приготовление эталонов сравнения. Отмеренное количество основного эталона, указанное в приведенной ниже таблице, помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем жидкости водой до метки и перемешивают.

Таблица 1 - Состав эталонов сравнения

	Эталоны сравнения			
	I	**II**	**III**	**IV**
Основной эталон, мл	5,0	10,0	30,0	50,0
Вода, мл	95,0	90,0	70,0	50,0

Примечание. Перед применением исходный, основной и эталоны сравнения перемешивают и встряхивают в течение 3 мин.

Эталоны сравнения I, II, III и IV должны быть свежеприготовленными.

Для оценки прозрачности и степени мутности жидкостей допускается использование спектрофотометров или специальных приборов типа турбидиметров, нефелометров или эквивалентных, если это предусмотрено фармакопейной статьей. В таком случае в фармакопейной статье должны быть указаны необходимые условия проведения испытания.

Определение распределения частиц по размеру методом лазерной дифракции света	**ОФС.1.2.1.0008.15** **Вводится впервые**

Метод лазерной дифракции света, используемый для определения распределения частиц по размеру, основан на анализе профиля рассеяния света, возникающего при освещении частицы коллимированным лазерным лучом. Традиционно метод позволяет измерять частицы в диапазоне от 0,1 мкм до 3,0 мм. Современные достижения в приборостроении позволили расширить этот диапазон (от 0,1 мкм до 8,0 мм).

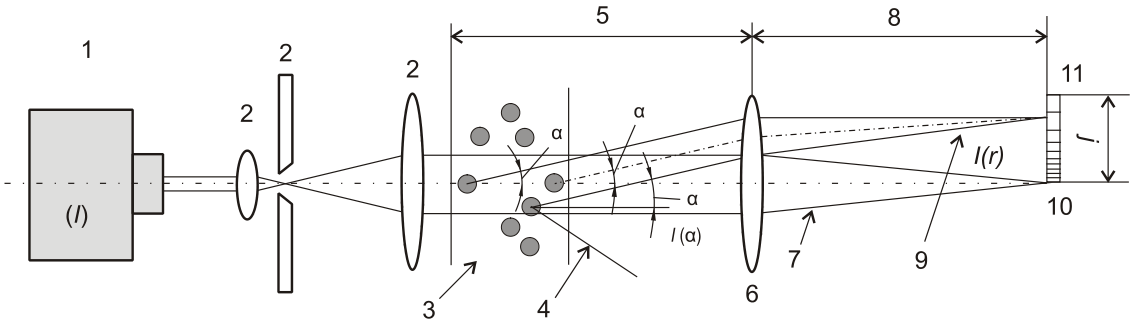
Область применения

Метод предназначен для контроля качества лекарственных препаратов (порошки, суспензии, эмульсии, пасты, настойки и др.) по показателю «Размер частиц и их распределение». Метод позволяет также определять, а затем и нормировать размер частиц и их распределение в субстанциях.

Оборудование

Схема прибора для лазерной дифракции представлена на рис. 1.

Взаимодействие луча падающего света и частиц дисперсной фазы приводит к образованию профиля рассеяния света с разными значениями интенсивности света при различных углах. Общее распределение угловой интенсивности, состоящее из прямого и рассеянного света, фокусируется линзой на многоэлементном детекторе. Линза создает профиль рассеяния света, который не зависит от расположения частиц в световом луче.



1 – источник лазерного излучения, 2 – модуль обработки лазерного излучения, 3 – частицы, 4 – рассеянный свет, не собранный линзой (6), 5 – рабочее расстояние линзы (6),6 – линза Фурье, 7 – прямой луч, 8 – фокусное расстояние линзы (6), 9 – рассеянный луч, 10 – детектор затемнения, 11 – многоэлементный детектор

Рисунок 1 – Схема прибора для определения размера частиц методом лазерной дифракции

Пробоподготовка

Методика пробоподготовки должна обеспечивать получение репрезентативного образца требуемого объема для измерения размера частиц.

Спреи, аэрозоли и пузырьки газа в жидкости измеряются непосредственно, поскольку пробоподготовка или разведение могут изменить распределение частиц по размеру.

Сыпучие порошки также можно преобразовать в аэрозоли при помощи диспергаторов, использующих энергию сжатого газа или перепады давления. Полученный аэрозоль проходит через зону измерения, после чего попадает во впускное отверстие вакуумного блока, где частицы аэрозоля собираются.

В качестве дисперсионной среды могут быть использованы вода и различные органические растворители (этиловый спирт, метиловый спирт, изопропиловый спирт, гексан, ацетон, толуол и другие), что должно быть отражено в фармакопейной статье.

Определение диапазона концентраций. Для того чтобы получить приемлемое соотношение «сигнал – шум» в детекторе, концентрация частиц в дисперсии должна превышать минимальный уровень. Также она должна быть меньше максимального уровня для избежания многократного рассеяния.

На диапазон концентраций влияют: ширина лазерного луча, расстояние, проходимое лучом лазера в зоне измерения, оптические свойства частиц и чувствительность элементов детектора. Измерения необходимо проводить при различных концентрациях частиц для определения оптимального диапазона концентраций для каждого характерного образца материала.

Принцип метода. Образец, диспергированный в жидкости или газе с необходимой концентрацией, подвергается воздействию лазерного облучения. Свет, рассеянный от частиц на различных углах, измеряется многоэлементным детектором. Численные значения, представляющие профиль рассеяния света, регистрируются для последующего анализа. В дальнейшем эти значения математически преобразуются с помощью оптической модели в доли от общего объема отдельных размерных классов, формируя, таким образом, объемное распределение частиц по размеру.

Метод не может отличить рассеяние от отдельных частиц и рассеяние от кластеров частиц, т. е. агломератов или агрегатов. В случае если образцы содержат агломераты или агрегаты частиц, и если необходимо определить распределение отдельных частиц по размеру, то перед измерением кластеры диспергируют на отдельные частицы. Для несферических частиц получают соответствующее распределение эквивалентных сфер по размеру, поскольку метод предполагает использование сферических частиц в своей оптической модели. Полученное распределение частиц по размеру может отличаться от распределений, основанных на других физических принципах (например, седиментации или ситовом определении).

Методика

Измерение размеров частиц осуществляют на малоугловых измерителях дисперсности (например, на приборе типа МИД-5) в соответствии с руководством по эксплуатации прибора и инструкцией пользователя.

После соответствующей регулировки оптической части прибора проводят фоновое измерение среды, в которой отсутствуют дисперсные частицы. Уровень сигнала фона должен быть ниже соответствующего порогового значения. После фонового измерения проводят измерение пробы. Обычно при измерении проводится большое число регистраций сигнала на элементах детектора и определяется среднее значение для каждого элемента. Положение и размер элементов детектора, фокусное расстояние линзы определяют диапазон углов рассеяния для каждого элемента.

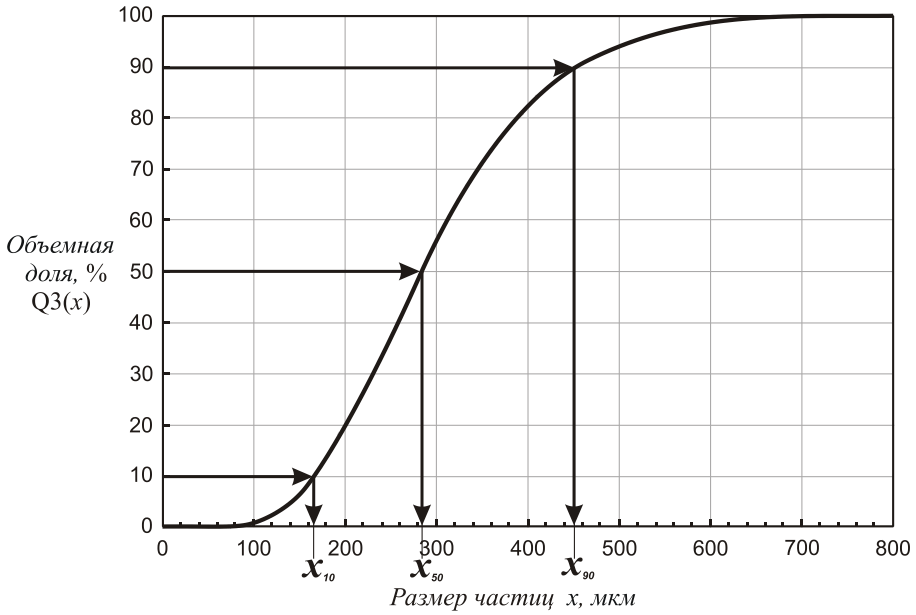
Большинство приборов также измеряют интенсивность центрального луча. Различие интенсивностей центрального луча в дисперсной системе и фонового измерения является параметром затемнения и свидетельствует об интенсивности рассеянного света и концентрации частиц.

Специфические условия проведения анализа по измерению размера частиц и их распределению в конкретных лекарственных средствах указывают в фармакопейных статьях.

Выбор оптической модели. В большинстве случаев применяют аппроксимацию Фраунгофера или теорию Ми. При размере частиц менее 25 мкм различия между оптическими моделями становятся более существенными. В этом диапазоне более точные результаты позволяет получать теория Ми. При использовании теории Ми в прибор необходимо ввести значения показателя преломления частиц и среды или их отношение.

Повторные измерения. Число повторных измерений зависит от конкретного материала. Обычно измеряют не менее трех репрезентативных образцов одной серии.

Результаты измерений. Результаты обычно представляют в виде интегрального объемного распределения частиц по размеру (рис. 2). Величины x_{m} отражают размер частиц, где m – доля частиц с размером x и менее. Для оценки распределения по размеру обычно используют значения x_{10}, x_{50} и x_{90}.



x – размер частиц, определяемый как диаметр объема эквивалентной сферы; Q3(x) – объемная доля частиц с размером x и менее; x_{10}, x_{50}, x_{90} – размер частиц, соответствующий объемной доле 10, 50 и 90 % соответственно

Рисунок 2 – Интегральное объемное распределение частиц по размеру

Калибровка прибора. Работа прибора базируется на основных принципах рассеяния лазерного излучения при условии идеализированных свойств частиц, поэтому калибровка прибора перед измерением не требуется. Проверку правильности работы прибора можно осуществить путем измерения сертифицированного стандартного материала, состоящего из частиц известного распределения по размеру.

Поверка системы. Работу прибора необходимо подтверждать через регулярные интервалы времени или с надлежащей частотой. Поверку системы производят с использованием контрольного материала, известного распределения по размеру. Средние значения трех измерений должны отличаться от установленного значения не более чем на 10 % для x_{50} и не более чем на 15 % для x_{10} и x_{90}. Для $x < 10$ мкм эти величины необходимо удвоить.

Повторяемость. Предпочтительно использование сертифицированных или стандартных материалов, состоящих из сферических частиц известного распределения по размеру, с размерными группами, отличающимися по размеру более чем в 10 раз. Действие прибора считается соответствующим требованиям, если среднее значение x_{50} по крайней мере трех независимых

измерений сертифицированного или стандартного материала отличается не более чем на 3 % от установленного диапазона значений. Средние значения x_{10} и x_{90} не должны превышать установленный диапазон значений более чем на 5 %. Коэффициент вариации должен быть менее 3 % для x_{50} и менее 5 % для x_{10} и x_{90}. Для $x < 10$ мкм эти величины необходимо удвоить.

Воспроизводимость. Воспроизводимость метода, главным образом, зависит от характеристик материала (измельченный/неизмельченный, твердый/ломкий), а также от типа лекарственной формы. Обычно измеряют не менее трех репрезентативных образцов одной серии. Коэффициент вариации должен быть менее 10 % для x_{50}. Для значений x_{10} и x_{90} коэффициент вариации должен быть менее 15 %. Для $x < 10$ мкм эти величины необходимо удвоить.

Меры предосторожности. При проведении измерений жидких дисперсий необходимо избегать появления пузырьков воздуха, испарения жидкости или других неоднородностей дисперсии. При работе с сухими дисперсиями необходимо избегать неравномерного потока частиц от диспергатора или турбулентного воздушного течения. Такие эффекты могут вызывать ложные распределения частиц по размеру.

Оптическая микроскопия	**ОФС.1.2.1.0009.15** **Вводится впервые**

Оптической микроскопией называют совокупность методов наблюдения и исследования частиц анализируемых образцов лекарственных средств, невидимых невооруженным глазом, с помощью оптического микроскопа.

Размер частиц, которые могут быть исследованы данным методом, определяется разрешающей способностью микроскопа и обычно составляет 1 мкм и более. Однако при необходимости могут быть использованы микроскопы с общим увеличением более 1500, что позволяет характеризовать объекты размером от 0,5 мкм с разрешением отдельных структур объекта до 0,1 мкм.

Область применения

В фармакопейном анализе оптическую микроскопию применяют для определения размера частиц при контроле качества мягких лекарственных форм, суспензий, эмульсий, аэрозолей; в технологии лекарственных форм – для определения степени измельчения субстанций и вспомогательных веществ, а также для исследования кристаллических субстанций, так как форма, окраска и размер кристаллов являются индивидуальными характеристиками вещества.

Оборудование

Обычно оптический микроскоп имеет двухступенчатую систему увеличения, образованную объективом и окуляром.

Все узлы микроскопа монтируются на массивном основании. На основании установлен тубусодержатель, в котором укреплен тубус с объективом и окуляром. Под объективом находится предметный столик, под которым расположена осветительная система (зеркало, коллектор, конденсор). Для освещения объекта наблюдения может быть использован как естественный свет, так и специальные источники света (встроенный или внешние осветители).

Микроскоп может быть снабжен дополнительными приспособлениями (фазово-контрастными устройствами, конденсорами темного поля, поляризаторами, анализаторами и др.) и, в зависимости от выбранного метода наблюдения, может быть светлопольным, темнопольным, фазово-контрастным, поляризационным и др.

Испытуемый объект помещают на предметный столик. Свет от источника света, проходя через осветительную систему, испытуемый объект и объектив, попадает в окуляр или установленную вместо него систему регистрации, фото- или видеокамеру. Через окуляр осуществляют визуальное исследование объекта, а соединенная с компьютером цифровая фото- или видеокамера позволяет регистрировать изображения объекта, после чего их можно обрабатывать по специальным программам в полу- или полностью автоматическом режиме.

Увеличение микроскопа (произведение увеличений объектива, окуляра и дополнительных приставок) должно быть достаточным для адекватного описания и определения размеров самых мелких частиц образца.

Для каждого диапазона увеличения следует выбирать максимальную числовую апертуру объектива. Для контроля контрастности и детализации изображения окрашенных объектов рекомендуется использовать цветные фильтры с относительно узким спектром пропускания. Цветные фильтры могут применяться и для ахроматических (бесцветных) объектов.

Настройку всех элементов оптической системы, фокусировку и калибровку проводят в соответствии с прилагаемой к микроскопу

инструкцией.

Пробоподготовка

Испытуемые образцы можно исследовать как без использования, так и с использованием иммерсионной жидкости. Природа применяемой иммерсионной жидкости в значительной степени определяется физическими свойствами испытуемого образца, который не должен в ней растворяться. Если нет других указаний, в качестве иммерсионной жидкости при исследовании фармацевтических субстанций и вспомогательных веществ используют минеральное масло.

Частицы порошка должны находиться в одной плоскости и должны быть диспергированы так, чтобы были видны отдельные частицы (недопустимо слипание частиц).

Кроме того, при приготовлении образца для микроскопии (в том числе, при диспергировании в иммерсионной жидкости) должны быть сохранены первоначальный размер частиц и их распределение по размерам, свойственные испытуемому образцу.

Лекарственные формы анализируют без разведения или разводят, как указано в фармакопейной статье.

Методика

При исследовании порошков 5 – 10 мг порошка суспендируют в 10 мл иммерсионной жидкости, добавляя при необходимости смачивающий агент. 1 – 2 капли полученной гомогенной суспензии, содержащей не менее 10 мкг вещества, помещают на предметное стекло в счетное поле микроскопа.

Предел размера частиц и допустимое количество частиц, превышающее этот предел, для каждой субстанции указан в фармакопейной статье или определяется целью проводимых исследований.

Анализ лекарственных форм (по показателю «Размер частиц») проводят, как указано в соответствующей фармакопейной статье.

Характеристика формы частиц

На рис. 1 представлены наиболее часто встречающиеся формы частиц.

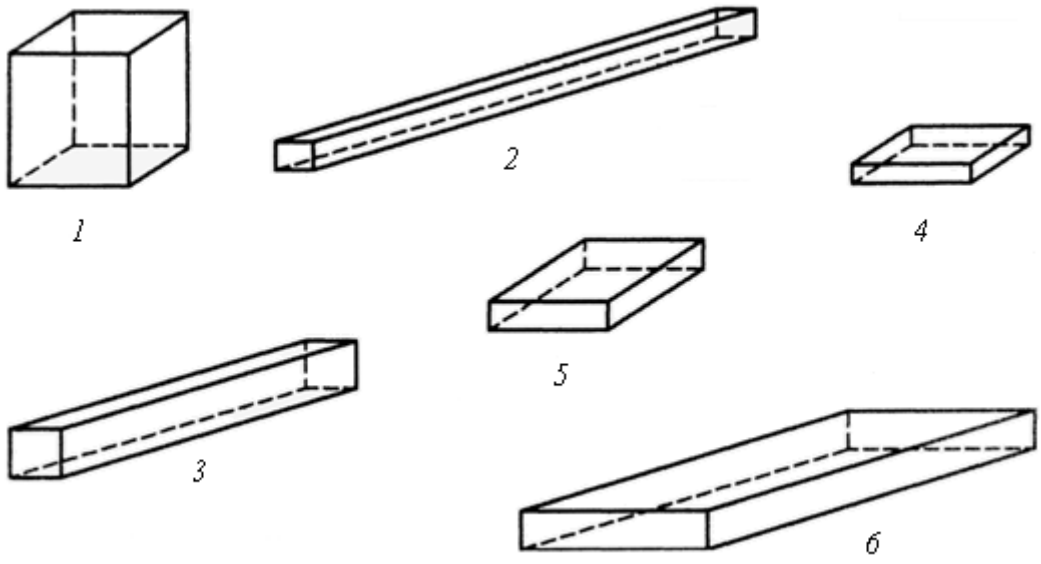


Рисунок 1 – Формы частиц.

1 – равносторонние: частицы с одинаковой длиной, шириной и толщиной, включая кубические и сферические частицы;

2 – игольчатые: тонкие, похожие на иглу частицы, или сходные с ней по соотношению длины и толщины;

3 – колоннообразные: длинные, тонкие частицы с шириной и толщиной больше, чем игольчатые;

4 – чешуйчатые: тонкие, плоские с одинаковой шириной и длиной;

5 – пластинчатые: плоские, одинаковые по длине и ширине, но с большей толщиной, чем чешуйчатые;

6 – планкообразные: крупные, тонкие, пластинчатые частицы.

Частицы могут быть иной, неопределенной формы.

Характеристика размера частиц

Способ определения размера частицы зависит от ее формы. Для сферических частиц размер определяется диаметром. Размер частиц, представленных на рис. 1, обычно определяют по значению максимальной длины.

На рис. 2 представлены размеры, обычно используемые для характеристики частиц неправильной формы.

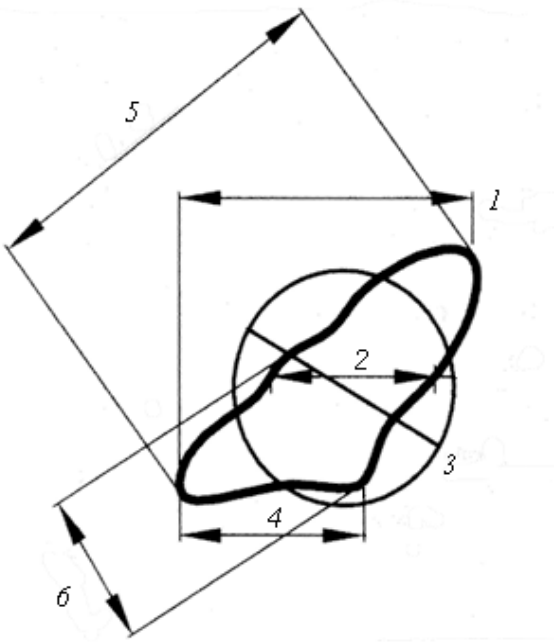


Рисунок 2 – Способы определения размеров частиц неправильной формы.

1.Диаметр Фере – расстояние между параллельными линиями, касательными к случайно ориентированной частице и перпендикулярными к шкале окуляра;

2.Диаметр Мартина – длина хорды, которая делит площадь проекции случайно ориентированной частицы на две равные части;

3.Эквивалентный диаметр – диаметр окружности, площадь которой равна площади проекции частицы;

4.Максимальный размер по горизонтали;

5.Длина – максимальный размер частицы, ориентированной параллельно шкале окуляра, от одного ее конца до другого;

6.Ширина – максимальный размер частицы, измеренный под прямым углом к длине.

Под единичной частицей, как правило, подразумевают мельчайшее образование. Частица может быть жидкой или вязкой каплей, моно- или поликристаллической, аморфной или агломератом; частицы могут быть ассоциированными.

По степени ***ассоциации*** частицы могут быть описаны следующими терминами:

– *ламеллары* – скученные пластинки;

– *агрегаты* – масса слипшихся частиц;

– *агломераты* – сплавленные или сцементированные частицы;

– *конгломераты* – смесь двух или более типов частиц;

– *сферолиты* – сферический кластер тонких игольчатых кристаллов;

– *друзы* – частицы, покрытые очень мелкими частицами.

Поверхность частиц может быть описана следующим образом:

– *гладкая* – свободная от неровностей, шероховатости или налипаний;

– *шероховатая* – неровная, негладкая;

– *ломкая* – частично расщепленная, разрушенная, с трещинами;

– *пористая* – имеющая отверстия или ходы;

– *изрытая* – с маленькими выемками.

Частицы могут быть описаны также:

– *по форме краев* – угловатые, зазубренные, гладкие, острые, ломкие;

– *по оптическим свойствам* – окрашенные, прозрачные, полупрозрачные, непрозрачные;

– *по наличию дефектов* – без включений, с включениями.

Потеря в массе при высушивании **ОФС.1.2.1.0010.15**

Настоящая общая фармакопейная статья предназначена для определения потери в массе при высушивании в лекарственных средствах и в иммунобиологических лекарственных препаратах. Под понятием «Потеря в массе при высушивании» подразумевают потерю в массе за счет гигроскопической влаги и летучих веществ, которую определяют в веществе при высушивании до постоянной массы, или в течение времени, указанного в фармакопейной статье или нормативной документации.

Определение потери в массе при высушивании проводят приведенными ниже способами или иными валидированными методами, указанными в фармакопейной статье или нормативной документации. Результат выражают в виде массовой доли в процентах.

Методика высушивания

Точную навеску испытуемого вещества, указанную в фармакопейной статье или нормативной документации, помещают в предварительно высушенный до постоянной массы и взвешенный в условиях проведения испытания бюкс. Пробу сушат с открытой крышкой бюкса до постоянной массы или в течение времени, указанного в фармакопейной статье или нормативной документации, одним из следующих способов.

Способ 1. Пробу высушивают в сушильном шкафу. Высушивание проводят в течение 2 ч при 105 °С, если не указано иначе. Затем открытый

бюкс вместе с крышкой помещают в эксикатор для охлаждения на 50 мин, после чего закрывают крышкой и взвешивают. Последующие взвешивания проводят после каждого часа дальнейшего высушивания до достижения постоянной массы.

Способ 2. Высушивание проводят над фосфора(V) оксидом одним из следующих методов:

– при атмосферном давлении и комнатной температуре;

– в вакууме при комнатной температуре или температуре, указанной в фармакопейной статье или нормативной документации;

– в «глубоком вакууме»: при давлении не более 0,1 кПа при температуре, указанной в фармакопейной статье или нормативной документации.

Возможно использование иных условий, указанных в фармакопейной статье или нормативной документации.

Способ 3. Пробу высушивают в течение 2 ч в вакуумном сушильном шкафу в пределах температурного интервала, указанного в фармакопейной статье или нормативной документации. Затем давление в шкафу уравнивают с атмосферным, открытый бюкс вместе с крышкой помещают в эксикатор для охлаждения на 50 мин, после чего закрывают крышкой и взвешивают. Последующие взвешивания проводят после каждого часа дальнейшего высушивания до достижения постоянной массы. При отсутствии других указаний пробу сушат до постоянной массы при остаточном давлении 20 мм рт. ст. (2,66 кПа).

Методика определения потери в массе при высушивании в иммунобиологических лекарственных препаратах

Для проведения анализа используют бюксы высотой 35 мм и диаметром 25 мм. Точную навеску 0,15-0,20 г испытуемого образца помещают в бюкс и высушивают с открытой крышкой при температуре 60±1°С и остаточном давлении, не превышающем 0,667 кПа (5 мм рт. ст.), в

течение 3 ч. Открытый бюкс вместе с крышкой помещают в эксикатор для охлаждения на 40 мин, после чего закрывают крышкой и взвешивают.

Потерю в массе при высушивании (X) в процентах вычисляют по формуле:

$$X = \frac{m_2 - m_3}{m_2 - m_1} \cdot 100\%,$$

где: m_1 – масса бюкса, доведенного до постоянной массы, г;
m_2 – масса бюкса с испытуемым образцом до высушивания, г;
m_3 - масса бюкса с испытуемым образцом после высушивания, г.

Температура плавления **ОФС.1.2.1.0011.18**

Взамен

ОФС.1.2.1.0011.15

Температурой плавления называют температуру, при которой происходит переход вещества из твердого состояния в жидкое.

Для определения температуры плавления в зависимости от физических свойств вещества применяют капиллярный метод (метод 1), открытый капиллярный метод (метод 2), метод мгновенного плавления (метод 3), метод каплепадения (метод 4) и инструментальный метод (метод 5). Для твердых веществ, легко превращаемых в порошок, применяют методы 1 и 3, для аморфных веществ, не растирающихся в порошок и плавящихся ниже температуры кипения воды (таких как жиры, воск, парафин, вазелин, смолы), – методы 2 и 4.

Для веществ, не устойчивых при нагревании, определяют температуру разложения. Температурой разложения называют температуру, при которой происходит резкое изменение физического состояния или окраски вещества (вспенивание, побурение).

Для определения температуры плавления используют описанные ниже приборы и методы. Для калибровки приборов используют подходящие для этих целей стандартные вещества, имеющие температуру плавления, близкую к температуре плавления испытуемого вещества.

1. Капиллярный метод

Температура плавления, определенная капиллярным методом, представляет собой температуру, при которой последняя твердая частичка уплотненного столбика вещества в капилляре переходит в жидкую фазу.

Прибор 1. Составными частями прибора являются:

- стеклянный сосуд, содержащий жидкость (например, воду, вазелиновое или силиконовое масло), используемый в качестве бани и оснащенный подходящим устройством для нагрева. Жидкость в бане следует выбирать в зависимости от требуемой температуры;

- устройство для перемешивания, обеспечивающее однородность температуры внутри бани;

- подходящий термометр с ценой деления не более 0,5 °С. Разность между верхним и нижним делениями термометра в области измеряемой температуры – не более 100 °С;

- запаянные с одного конца капилляры из нейтрального прочного стекла диаметром от 0,9 до 1,1 мм, толщиной стенок от 0,10 до 0,15 мм и длиной 10 см.

Прибор 2. Составными частями прибора являются:

- круглодонная колба из термостойкого стекла вместимостью от 100 до 150 мл; длина горла колбы 20 см; диаметр горла – от 3 до 4 см;

- пробирка из термостойкого стекла, вставленная в колбу и отстоящая от дна колбы на расстоянии 1,0 см; диаметр пробирки от 2,0 до 2,5 см;

- термометр ртутный стеклянный укороченный с ценой деления 0,5 °С, вставленный во внутреннюю пробирку так, чтобы конец его отстоял от дна пробирки на 1,0 см;

- источник нагрева (газовая горелка, электрический обогрев);

- запаянные с одного конца капилляры из нейтрального прочного стекла диаметром от 0,9 до 1,1 мм, толщиной стенок от 0,10 до 0,15 мм и длиной от 6 до 8 см.

Колбу наполняют на ¾ объема соответствующей жидкостью:

- вазелиновое масло или жидкие силиконы; серная кислота концентрированная – для веществ с температурой плавления от 80 до 260 °С;

- раствор калия сульфата в серной кислоте концентрированной (3:7 по массе) – для веществ с температурой плавления выше 260 °С;

- вода очищенная – для веществ с температурой плавления ниже 80 °С.

Примечания.

1. Стеклянные трубки, из которых вытягивают капилляры, должны быть вымыты и высушены.

2. При приготовлении раствора калия сульфата в серной кислоте концентрированной смесь кипятят в течение 5 мин при энергичном перемешивании. При недостаточном перемешивании могут образоваться 2 слоя, в результате чего может произойти закипание смеси, приводящее к взрыву.

Прибор 3. Прибор для определения температуры плавления с диапазоном измерений в пределах от 20 до 360 °С с электрическим обогревом типа ПТП или типа ПТП-М (рис. 1) с диапазоном измерений в пределах от 20 до 340 °С.

Составными частями прибора являются:

- основание со щитком управления и номограммой;

- стеклянный блок-нагреватель, обогрев которого осуществляется константановой проволокой, навитой бифилярно;

- оптическое приспособление;

- приспособление для установки термометра;

- приспособление для установки капилляров;

- термометр укороченный с ценой деления 0,5 ºС;

- источник нагрева (электрический обогрев);

- капилляры длиной 20 см для прибора типа ПТП; капилляры длиной 8 см для прибора типа ПТП-М.

Принцип действия прибора основан на температурном воздействии на исследуемые вещества в вертикально установленных капиллярах, запаянных с нижнего конца.

Допускается применение других приборов, использующих капиллярный метод, если точность и правильность измерений будут не хуже, чем в случае применения приборов, описанных выше.

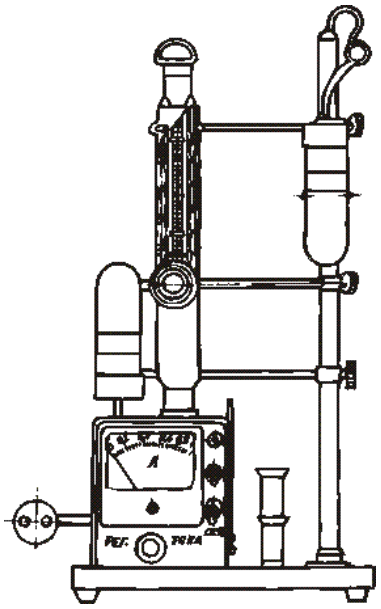


Рисунок 1– Прибор ПТП-М для определения температуры плавления

Методика. Если нет других указаний в фармакопейной статье, тонкоизмельченное в порошок вещество сушат или при температуре от 100 до 105 °С в течение 2 ч или в эксикаторе над серной кислотой в течение 24 ч, или в вакууме над безводным силикагелем в течение 24 ч.

Достаточное количество вещества помещают в капилляр до получения уплотненного столбика высотой около 5 мм. Необходимое уплотнение вещества при заполнении капилляра можно получить, если его несколько раз бросить запаянным концом вниз в стеклянную трубку длиной 0,5 – 1,0 м, поставленную вертикально на стекло. Капилляр с веществом сохраняют до начала определения в эксикаторе.

Повышают температуру в бане (приборе). При температуре приблизительно на 10 °С ниже предполагаемой температуры плавления регулируют нагрев прибора так, чтобы скорость подъема температуры на

протяжении всего испытания составляла около 1 °С в мин. Когда температура достигнет значения на 5 – 10 °С ниже предполагаемой температуры плавления, капилляр с веществом прикрепляют к термометру так, чтобы его запаянный конец находился на уровне центра шарика термометра, и помещают в прибор.

Продолжают нагревание со скоростью:

- для устойчивых при нагревании веществ при определении температуры плавления ниже 100 °С – со скоростью от 0,5 до 1,0 °С в 1 мин;
- при определении температуры плавления от 100 до 150 °С – от 1,0 до 1,5 °С в 1 мин;
- при определении температуры плавления выше 150 °С – от 1,5 до 2,0 °С в 1 мин;
- для неустойчивых при нагревании веществ от 2,5 до 3,5 °С в 1 мин.

Отмечают температуру, при которой последняя твердая частичка перейдет в жидкую фазу.

Проводят не менее двух определений. За температуру плавления принимают среднее арифметическое значение нескольких определений, проведенных в одинаковых условиях и отличающихся друг от друга не более чем на 1 °С.

Примечание. Во время определения температуры плавления колба и пробирка должны быть открыты.

2. Открытый капиллярный метод

Используют стеклянный капилляр, открытый с обоих концов, длиной около 80 мм, наружным диаметром от 1,4 до 1,5 мм и внутренним диаметром от 1,0 до 1,2 мм.

Вещество, предварительно подготовленное, как указано в фармакопейной статье, помещают в каждый из 5 капилляров в количестве, достаточном для формирования в каждом капилляре столбика высотой около

10 мм. Капилляры оставляют на определенное время при температуре, указанной в фармакопейной статье.

Прикрепляют один из капилляров к термометру с ценой деления 0,2 °С таким образом, чтобы вещество находилось около шарика термометра.

Термометр с прикрепленным капилляром помещают в стакан таким образом, чтобы расстояние между дном стакана и нижней частью шарика термометра составляло 1 см. Стакан наполняют водой до высоты слоя 5 см.

Повышают температуру воды со скоростью 1 °С в мин.

За температуру плавления принимают температуру, при которой вещество начинает подниматься по капилляру. В тех случаях, когда столбик вещества не поднимается в капилляре, за температуру плавления принимают температуру, при которой столбик вещества в капилляре становится прозрачным.

Повторяют эту операцию с 4 другими капиллярами и рассчитывают результат как среднее арифметическое из 5 значений. Расхождение между всеми значениями не должно превышать 1 °С.

3. Метод мгновенного плавления

Прибор. Прибор состоит из металлического блока, изготовленного из материала, обладающего высокой теплопроводностью и не взаимодействующего с испытуемым веществом, например, из латуни. Верхняя поверхность блока должна быть плоской и тщательно отполированной. Блок равномерно нагревают по всей массе газовой горелкой с микрорегулировкой или электрическим нагревателем с тонкой регулировкой. Блок имеет достаточно широкую цилиндрическую полость для размещения термометра, столбик ртути которого должен находиться в одном и том же положении, как при калибровке, так и при определении температуры плавления испытуемого вещества. Цилиндрическая полость размещена параллельно отполированной верхней поверхности блока на расстоянии около 3 мм от нее.

Методика. Блок быстро нагревают до температуры, которая на 10 °С

ниже предполагаемой температуры плавления, и затем устанавливают скорость нагрева около 1 °С в минуту. Несколько частичек тонкоизмельченного в порошок вещества, высушенного в вакууме над безводным силикагелем в течение 24 ч, бросают через равные промежутки времени на поверхность блока в непосредственной близости от шарика термометра, очищая поверхность после каждого испытания. Записывают температуру t_1, при которой вещество плавится мгновенно при соприкосновении с металлом. Останавливают нагрев. Во время охлаждения через равные промежутки времени бросают несколько частичек вещества на поверхность блока, очищая ее после каждого испытания. Записывают температуру t_2, при которой вещество прекращает мгновенно плавиться при соприкосновении с металлом.

Температуру плавления ($T_{\text{пл.}}$) рассчитывают по формуле:

$$T_{\text{пл}} = \frac{t_1 + t_2}{2},$$

где t_1 – первое значение температуры;
t_2 – второе значение температуры.

4. Метод каплепадения

В данном методе определяют температуру, при которой в условиях, приведенных ниже, первая капля расплавленного испытуемого вещества падает из чашечки.

Прибор. Прибор состоит из двух металлических гильз (*А* и *Б*), соединенных посредством резьбы. Гильза (*А*) прикреплена к ртутному термометру. В нижней части гильзы (*Б*) с помощью двух уплотнителей (*Г*) свободно закреплена металлическая чашечка (*Д*). Точное положение чашечки определяется фиксаторами (*Е*) длиной 2 мм, которые используются также для центровки термометра. Отверстие (*В*) в стенке гильзы (*Б*) предназначено для выравнивания давления. Отводящая поверхность чашечки должна быть плоской, а края выходного отверстия расположены под прямым углом к

поверхности. Нижняя часть ртутного термометра имеет форму и размер, как показано на рис.2. Термометр градуирован от 0 до 110 ºС и расстояние на шкале в 1 мм соответствует разности температур в 1 ºС. Ртутный шарик термометра имеет диаметр (3,5 ± 0,2) мм и высоту (6,0 ± 0,3) мм.

Прибор устанавливают по оси пробирки длиной около 200 мм и наружным диаметром около 40 мм.

Прибор прикрепляют к пробирке с помощью пробки, в которую вставлен термометр и которая имеет боковую прорезь. Отверстие чашечки должно находиться на расстоянии около 15 мм от дна пробирки. Все устройство погружают в стакан вместимостью около 1 л, заполненный водой. Дно пробирки должно находиться на расстоянии около 25 мм от дна стакана. Уровень воды должен достигать верхней части гильзы (*А*). Для равномерного распределения температуры в стакане используют мешалку.

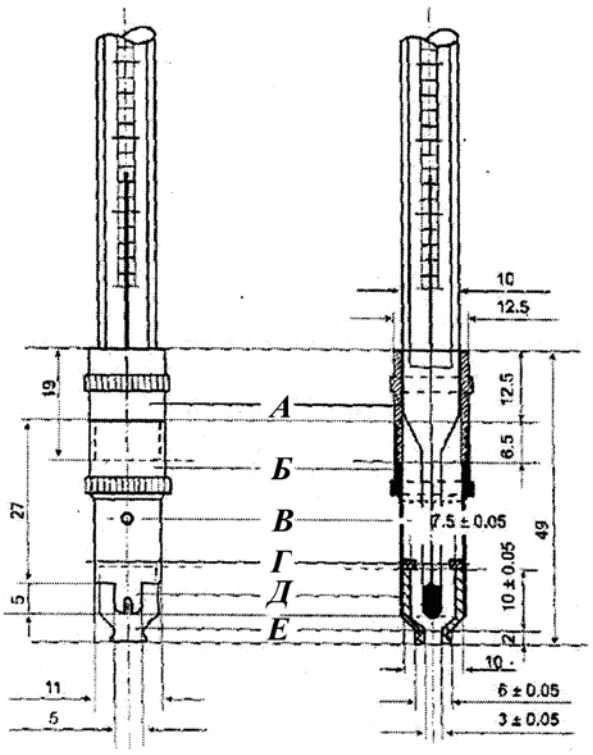


Рисунок 2 – Прибор для определения температуры каплепадения.
Размеры приведены в мм

Методика. Заполняют чашечку до краев нерасплавленным испытуемым веществом, если нет других указаний в фармакопейной статье. Избыток вещества удаляют с обеих сторон шпателем. После соединения гильз (*А*) и (*Б*) проталкивают чашечку внутрь на ее место в гильзе (*Б*) до упора. Удаляют шпателем вещество, выдавленное термометром. Прибор помещают на водяную баню, как описано выше. Водяную баню нагревают до температуры примерно на 10 ºС ниже предполагаемой температуры плавления и устанавливают скорость нагрева около 1 ºС в минуту. Отмечают температуру падения первой капли. Проводят не менее трех определений, каждый раз с новым образцом вещества. Разность между показаниями не должна превышать 3 °С. Рассчитывают среднее арифметическое из полученных значений.

5. Инструментальный метод

В данном методе описано измерение температуры плавления с помощью капилляра с использованием инструментального метода определения.

Прибор. Существуют два способа автоматической регистрации:

- способ А: измерение пропускания света через капиллярную трубку, заполненную образцом;

- способ В: измерение отражения света, от образца в капиллярной трубке.

В обоих способах капиллярную трубку помещают в полость металлического блока с электрическим нагревом и контролируют с помощью температурного датчика, размещенного в другой полости металлического блока. Нагревательный элемент в блоке способен поддерживать заданную температуру с точностью до ± 0,1 °С, а также обеспечивать медленный и постоянный подъем температуры со скоростью нагрева 1 °С/мин после начального изотермического периода.

В способе А луч света проходит через горизонтальную полость в нагревательном блоке и пересекает капиллярную трубку. Датчик

регистрирует луч в конце цилиндрического отверстия за капиллярной трубкой.

В способе В луч света освещает капиллярную трубку спереди, а датчик записывает отраженный сигнал.

Некоторые модели приборов позволяют проводить визуальное определение точки плавления.

Температуру, при которой сигнал датчика впервые меняет свое начальное значение, считают началом плавления, а температуру, при которой сигнал датчика достигает своего конечного значения — концом плавления, или *температурой плавления*.

Используют стеклянные капиллярные трубки открытые с одного конца, длиной около 100 мм, наружным диаметром 1,3—1,5 мм и внутренним диаметром 0,8—1,3 мм. Толщина стенки капиллярной трубки составляет 0,1—0,3 мм.

Некоторые модели приборов позволяют определять температуру плавления более чем на одной капиллярной трубке.

Методика. Вещество, предварительно обработанное согласно указаниям в частной фармакопейной статье, помещают в капиллярную трубку в количестве, достаточном для формирования плотного столбика высотой около 4 мм в каждой капиллярной трубке и выдерживают в течение определенного времени при температуре, указанной в частной фармакопейной статье.

Далее поступают в соответствии с инструкцией производителей приборов или следующим образом. Нагревают нагревательный блок до температуры примерно на 5 °С ниже ожидаемой температуры плавления. Помещают капиллярную трубку в нагревательный блок запаянным концом вниз. Включают температурную программу. Когда вещество начинает плавиться, изменяется его внешний вид в капиллярной трубке, в результате чего после изменения сигнала фотодатчика, обусловленного пропусканием

света (рисунок 3) или изменением отражения (рисунок 4), автоматически будет записана температура нагревательного блока.

Проводят испытание еще для двух других образцов и рассчитывают среднее значение по трем результатам.

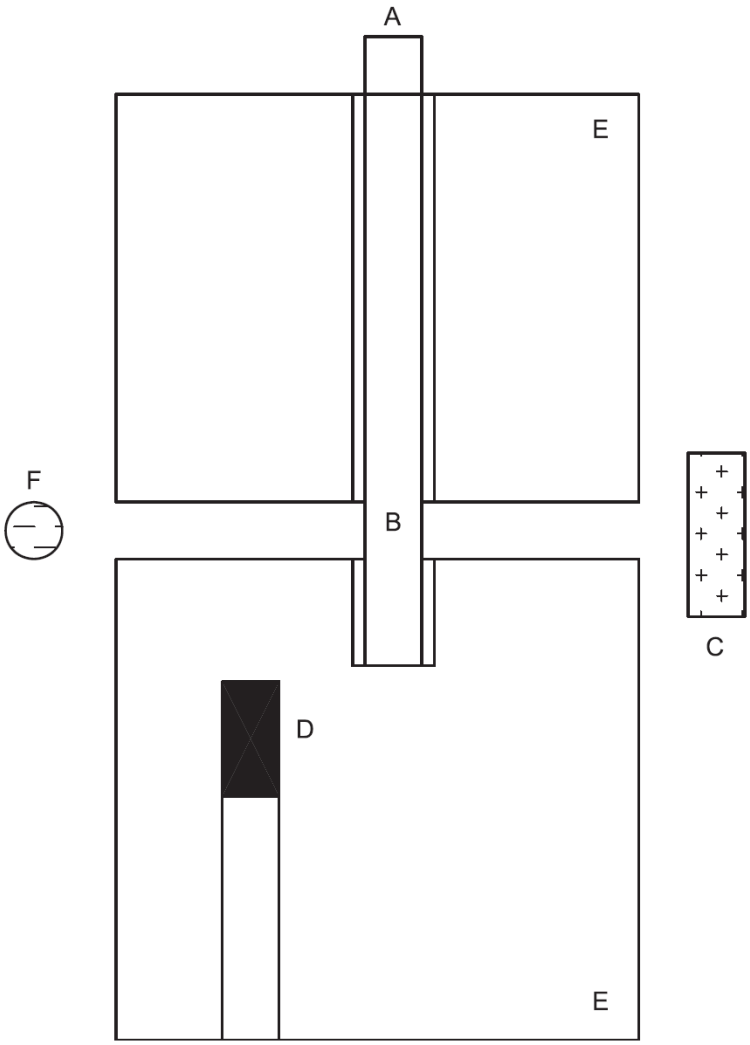


Рисунок 3 – Способ А — пропускание.

A. Стеклянная капиллярная трубка;

B. Испытуемый образец;

C. Фотодатчик;

D. Температурный датчик;

E. Нагревательный блок;

F. Источник излучения.

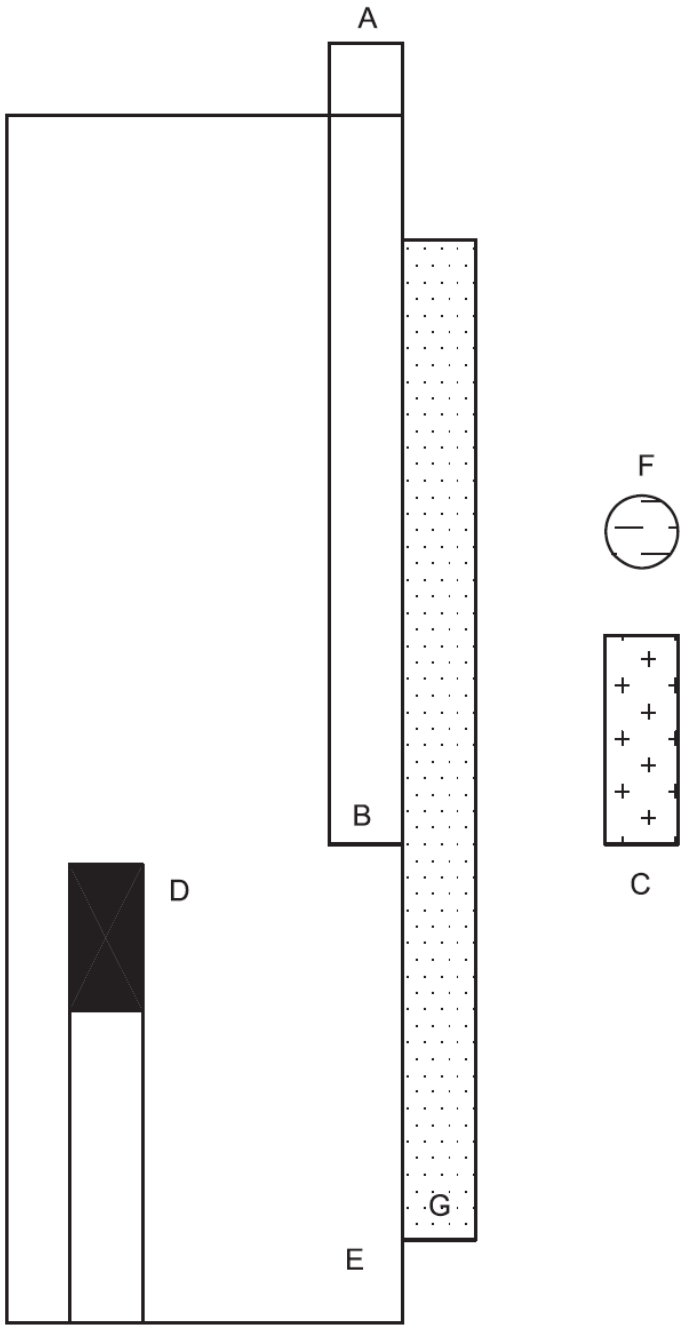


Рисунок 4 – Способ B — отражение.

A. Стеклянная капиллярная трубка;

B. Испытуемый образец;

C. Датчик; D. Температурный датчик;

E. Нагревательный блок;

F. Источник излучения;

G. Прозрачная пластинка.

Калибровка. Температурная шкала прибора периодически проверяется путем измерения температуры плавления сертифицированных стандартных образцов. Для этого используют капиллярные трубки таких же размеров, что и при измерении температуры плавления испытуемых образцов (см. «Прибор»).

Готовят три капиллярные трубки для каждого из не менее двух сертифицированных стандартных образцов. Проводят испытание и рассчитывают среднее значение трех определений для каждого стандартного образца.

Пригодность системы. В дополнение к калибровке перед измерениями проводят верификацию с использованием подходящего сертифицированного стандартного образца с температурой плавления, близкой к предполагаемому значению температуры плавления вещества.

Готовят три капиллярные трубки, проводят испытание и рассчитывают среднее значение трех определений.

Среднее значение находится в пределах допустимых отклонений, указанных в сертификате, прилагаемом к сертифицированному стандартному образцу.

Температура затвердевания	**ОФС.1.2.1.0012.15** **Взамен ГФ X** **Взамен ст. ГФ XI, вып. 1** **Взамен ГФ XII, ч.1, ОФС 42-0035-07**

Температурой затвердевания называют температуру, при которой вещество переходит из жидкого состояния в твердое при охлаждении. Для определения температуры затвердевания используют две методики.

Методика 1. В сухую внутреннюю пробирку прибора 1 (рис.1) помещают достаточное количество (около 10 г) испытуемого вещества, находящегося в жидком состоянии (твердое вещество предварительно расплавляют при температуре не выше 20 °С ожидаемой температуры затвердевания) и укрепляют таким образом, чтобы ртутный шарик находился посередине слоя испытуемого вещества. Затем внутреннюю пробирку с испытуемым веществом помещают во внешнюю пробирку и, при быстром охлаждении, определяют приблизительную температуру затвердевания. После этого внешнюю пробирку вместе с внутренней помещают на водяную баню с температурой на 5 ºС выше приблизительно определенной температуры затвердевания до полного расплавления испытуемого вещества. Затем заполняют стакан водой или насыщенным раствором натрия хлорида с температурой на 5 °С ниже ожидаемой температуры затвердевания. Внешнюю пробирку вместе с внутренней помещают в стакан. При постоянном перемешивании испытуемого вещества отмечают температуру каждые 30 с. Вначале происходит постепенное понижение температуры, затем при появлении твердой фазы, она остается некоторое время

постоянной или повышается перед тем, как стать постоянной (в этот момент прекращают перемешивание), а затем снова падает. Отмечают наиболее высокую температуру, остающуюся короткое время постоянной при переходе вещества из жидкого состояния в твердое. Эту температуру и принимают за температуру затвердевания.

Если вещество остается жидким при ожидаемой температуре затвердевания, его охлаждают на 1 – 2 °С ниже ожидаемой температуры затвердевания и вызывают затвердевание введением малых количеств (нескольких кристаллов) испытуемого вещества или потиранием стенок внутренней пробирки термометром.

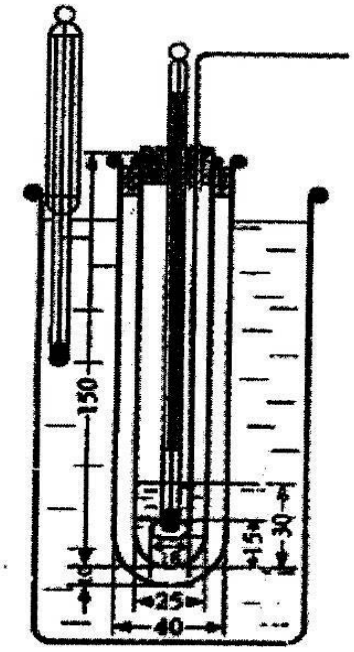


Рисунок 1. Прибор для определения температуры затвердевания

Размеры указаны в мм

Прибор 1. Прибор (рис.1) состоит из толстостенной пробирки с внутренним диаметром около 25 мм и длиной около 150 мм, помещенной внутрь другой пробирки диаметром около 40 мм и длиной около 160 мм. Внутренняя пробирка закрыта пробкой, снабженной термометром длиной около 175 мм с ценой деления 0,2 °С, который закреплен таким образом, чтобы ртутный шарик находился на расстоянии около 15 мм от дна

пробирки. Во внутренней пробирке имеется отверстие, через которое проходит вал мешалки, изготовленный из стеклянного стержня или другого подходящего материала, согнутый на конце под прямым углом в виде петли, внешний диаметр которой около 18 мм. Внутреннюю пробирку вместе с внешней пробиркой размещают в центре стакана вместимостью 1 л, содержащего подходящую охлаждающую жидкость, уровень которой находится на расстоянии около 20 мм. Охлаждающая баня также должна быть снабжена термометром.

Методика 2. Для твердых веществ, имеющих высокую температуру затвердевания с диапазоном от +30 до +100 °С (парафины и высокоплавкие кристаллические вещества).

Испытуемое вещество, расплавленное на водяной бане или в термостате при температуре на 15 – 20 °С выше ожидаемой температуры затвердевания, тщательно перемешивают и заливают в подогретый прибор 2 (рис.2) на ¾ его высоты. Температура испытуемого вещества после помещения в прибор должна превышать ожидаемую температуру затвердевания не менее чем на 8 °С. В отверстие прибора вставляют термометр на пробке по оси прибора так, чтобы ртутный шарик термометра находился приблизительно на половине высоты слоя расплавленного вещества. Оставляют прибор до достижения температуры на 3 – 4 °С выше температуры затвердевания. По достижении этой температуры записывают температуру через каждую минуту. Сначала температура понижается быстро. Затем понижение замедляется, и температура в течение нескольких минут сохраняется постоянной или снижается очень медленно. После этого температура снова быстро понижается. За температуру затвердевания вещества принимают то показание термометра, при котором температура оставалась постоянной или снижалась наиболее медленно.

Рассчитывают среднее арифметическое трех определений. Расхождение между определениями не должно превышать 0,2 °С.

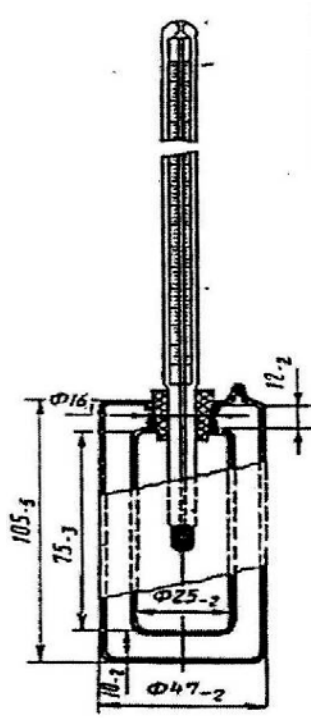


Рисунок 2. Прибор Жукова.

Размеры указаны в мм

Прибор 2 (прибор Жукова) – дьюаровский сосуд из прозрачного стекла (рис. 2). Снабжен пробкой, в которой укреплен термометр с диапазоном температур от +30 до +100 °С и ценой деления 0,2 °С.

Температурные пределы перегонки и точка кипения	**ОФС.1.2.1.0013.15** **Взамен ГФ X** **Взамен ст. ГФ XI, вып. 1** **Взамен ГФ XII, ч.1,** **ОФС 42-0036-07**

Под температурными пределами перегонки подразумевают интервал между начальной и конечной температурой кипения при нормальном давлении 101,3 кПа (760 мм рт. ст.).

Начальной температурой кипения считают температуру, при которой в приемник в процессе перегонки попали первые 5 капель жидкости. Конечной температурой кипения считают температуру, при которой в приемник перешло 95 % жидкости.

Точка кипения – скорректированная температура, при которой давление пара жидкости достигает 101,3 кПа.

Определение температурных пределов перегонки

Прибор. Прибор (рисунок) состоит из перегонной колбы (А), прямого холодильника (В) и аллонжа (С). Термометр помещают в горло перегонной колбы так, чтобы конец ртутного шарика находился на 5 мм ниже нижнего края отводной трубки перегонной колбы. Применяют укороченный термометр с верхним значением шкалы около 50 °С и ценой деления 0,2 °С.

Во время испытания колбу защищают от охлаждения соответствующим экраном.

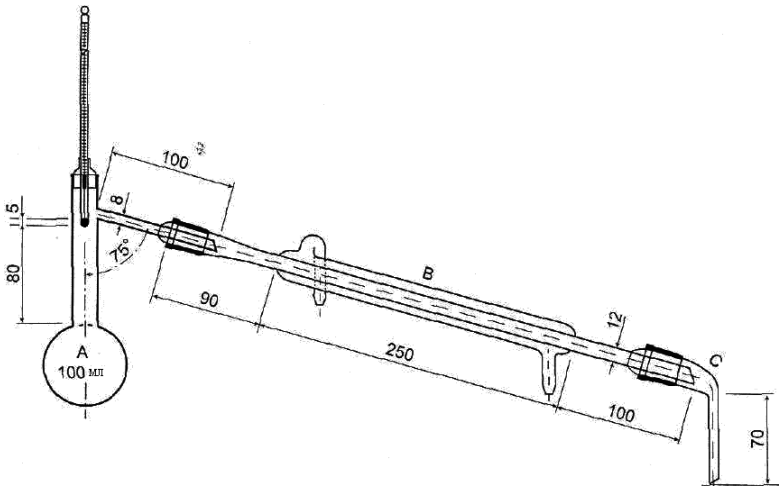


Рисунок – Прибор для определения температурных пределов перегонки.

А – перегонная колба; В – прямой холодильник; С – аллонж.

Размеры указаны в мм.

Для жидкостей, кипящих при температуре ниже 150 °С, применяют водяное охлаждение; для жидкостей, кипящих при температуре выше 150 °С, достаточно воздушного охлаждения.

Методика. В колбу вместимостью 100 мл помещают 50 мл исследуемой жидкости и несколько тонких запаянных с одного конца капилляров или кусочков пористого керамического материала.

Начинают нагревание колбы, отмечают начальную температуру кипения и продолжают нагревание таким образом, чтобы в 1 мин перегонялось 2 – 3 мл жидкости. Перегоняют требуемый объем жидкости, отмечая конечную температуру кипения. Отгон собирают в приемник (цилиндр вместимостью 50 мл с ценой деления 1 мл). Приемник устанавливают так, чтобы аллонж входил в него на 2,5 см.

Наблюдаемую температуру перегонки (t_1) приводят к нормальному давлению 101,3 кПа (760 мм рт. ст.) по формуле:

$$t_2 = t_1 + K \cdot (P - P_1), \qquad (1)$$

где t_2 – исправленная температура, °С;

t_1 – наблюдаемая температура, °С;

P – нормальное барометрическое давление, кПа или мм рт. ст.;

P_1 – барометрическое давление во время опыта, наблюдаемое по ртутному барометру или анероиду, кПа или мм рт. ст., с учетом

поправок, указанных в поверочном свидетельстве и в инструкции по эксплуатации;

К – поправочный коэффициент. Значения *К* зависят от температуры кипения перегоняемой жидкости и приведены в таблице.

Таблица – Поправочный коэффициент для приведения к нормальному значению

Наблюдаемая температура кипения, °С	**Поправочный коэффициент *К* при давлении, выраженном в**	
	мм рт. ст.	**кПа**
до 100	0,040	0,30
100 – 140	0,045	0,34
141 – 190	0,050	0,38
191 – 240	0,055	0,41
выше 240	0,060	0,45

Примечания.

1. Если во время опыта давление измеряют ртутным барометром, то после внесения поправок, указанных в поверочном свидетельстве и в инструкции по эксплуатации, давление приводят к показаниям при температуре 0 °С. Для чего вычитают из показаний барометра:

0,27 кПа (2 мм рт. ст.) при температуре окружающей среды 13 – 20 °С;

0,4 кПа (3 мм рт. ст.) при температуре окружающей среды 21 – 28 °С;

0,53 кПа (4 мм рт. ст.) при температуре окружающей среды 29 – 35 °С.

2. Перегонку эфира следует проводить на предварительно нагретой водяной бане при температуре от 54 до 58 °С.

Допустимое расхождение между результатами двух параллельных определений температуры кипения не должно превышать 1 °С.

Определение точки кипения

Испытание проводят в приборе для определения температурных пределов перегонки. Термометр помещают в горло колбы так, чтобы нижний конец ртутного шарика находился на уровне нижнего конца горла колбы. Применяют укороченный термометр с верхним значением шкалы около 50 °С и ценой деления 0,2 °С.

В колбу вместимостью 100 мл помещают 20 мл испытуемой жидкости и несколько кусочков пористого керамического материала и быстро

нагревают до кипения. Отмечают температуру, при которой жидкость начинает поступать по отводной трубке колбы в холодильник.

Отмеченную температуру кипения приводят к нормальному давлению по формуле (1).

Микрометод определения температуры кипения обычно используется для идентификации веществ.

В тонкостенную стеклянную запаянную с одного конца трубочку диаметром 3 мм и длиной около 8 см помещают несколько капель исследуемой жидкости, чтобы образовался слой от 1,0 до 1,5 см высоты. В трубочку вставляют открытым концом вниз запаянный с одного конца капилляр длиной около 10 см и диаметром около 1 мм. Трубочку прикрепляют с помощью резинового колечка или тонкой проволоки к укороченному термометру так, чтобы нижний конец трубочки находился на уровне середины ртутного шарика, и термометр помещают в прибор для определения температуры плавления. Нагревание ведут таким образом, чтобы температура поднималась на 2 – 3 ºС в минуту до того момента, когда из капилляра вместо отдельных воздушных пузырьков начнет выделяться непрерывная цепочка пузырьков пара, после чего прекращают или уменьшают нагрев. Момент, когда прекратится выделение пузырьков и жидкость начнет подниматься в капилляр, принимают за температуру кипения.

Наблюдаемую температуру кипения приводят к показаниям при нормальном давлении, как указано выше.

Плотность	**ОФС.1.2.1.0014.15** **ГФ X** **Взамен ст. ГФ XI, вып. 1** **Взамен ГФ XII, ч.1, ОФС 42-0037-07**

Плотностью называют массу единицы объема вещества: $\rho = \frac{m}{V}$. Если массу m измеряют в граммах, а объем V – в кубических сантиметрах, то плотность представляет собой массу 1 см^3 вещества: ρ, г/см^3. Плотность вещества ρ_{20} является отношением массы вещества к его объему при температуре 20 °С.

Относительная плотность вещества d_{20}^{20} является отношением массы определенного объема вещества к массе равного объема воды при температуре 20 °С. Относительная плотность вещества d_{4}^{20} является отношением массы определенного объема вещества при температуре 20 °С к массе равного объема воды при температуре 4 °С.

Формулы пересчета между относительной плотностью (d) и плотностью (ρ), выраженной в кг/м^3, следующие:

$$\rho_{20} = 998{,}202 \cdot d_{20}^{20} \text{ или } d_{20}^{20} = 1{,}00180 \cdot 10^{-3}\ \rho_{20},$$

$$\rho_{20} = 999{,}972 \cdot d_{4}^{20} \text{ или } d_{4}^{20} = 1{,}00003 \cdot 10^{-3}\ \rho_{20},$$

$$d_{4}^{20} = 0{,}998230 \cdot d_{20}^{20}.$$

Определение плотности проводят с помощью пикнометра, ареометра или плотномера.

Метод 1

Применяют для определения плотности жидкостей с точностью до $\pm 0{,}001$ г/см^3 с помощью пикнометра.

Чистый сухой пикнометр взвешивают с точностью до 0,0002 г, заполняют с помощью маленькой воронки водой очищенной немного выше метки, закрывают пробкой и выдерживают в течение 20 мин в термостате при температуре $(20 \pm 0{,}1)$ ºС. При этой температуре уровень воды в пикнометре доводят до метки, отбирая излишек воды при помощи пипетки или свернутой в трубку полоски фильтровальной бумаги. Пикнометр снова закрывают пробкой и выдерживают в термостате еще 10 мин. Затем пикнометр вынимают из термостата, проверяют положение мениска воды, который должен находиться на уровне метки. Вытирают фильтровальной бумагой внутреннюю поверхность горлышка и весь пикнометр снаружи, закрывают пробкой. Выдерживают пикнометр под стеклом аналитических весов в течение 10 мин и взвешивают с той же точностью.

Пикнометр освобождают от воды, высушивают, ополаскивая последовательно спиртом и эфиром (сушить пикнометр нагреванием не допускается), удаляют остатки эфира продуванием воздуха, заполняют пикнометр испытуемой жидкостью и проводят те же операции, что и с водой.

Плотность ρ_{20} (г/см^3) вычисляют по формуле:

$$\rho_{20} = 0{,}99703 \cdot \frac{(m_2 - m)}{(m_1 - m)} + 0{,}0012,$$

где m – масса пустого пикнометра, г;
m_1 – масса пикнометра с водой очищенной, г;
m_2 – масса пикнометра с испытуемой жидкостью, г;
0,99703 – значение плотности воды при 20 °С, г/см^3 (с учетом плотности воздуха);
0,0012 – значение плотности воздуха при 20 °С и барометрическом давлении 101,1 кПа (760 мм рт. ст.).

Метод 2

Применяют для определения плотности твердых жиров и воска с точностью до $\pm 0{,}001$ г/см^3 с помощью пикнометра.

Проводят все операции с водой очищенной и высушивают пикнометр, как описано в методе 1. При помощи пипетки или небольшой воронки с оттянутым концом вносят в пикнометр расплавленный жир или воск в таком количестве, чтобы он занимал 1/3 – 1/2 объема пикнометра. Пикнометр без пробки ставят на 1 ч в горячую воду, затем охлаждают до температуры 20 °С и взвешивают. Содержимое пикнометра доводят до метки водой очищенной при температуре 20 °С, вытирают пикнометр и снова взвешивают. В обеих фазах и на поверхности их раздела не должно быть пузырьков воздуха.

Величину плотности ρ_{20} вычисляют по формуле:

$$\rho_{20} = 0{,}99703 \cdot \frac{(m_2 - m)}{(m_1 + m_2) - (m + m_3)} + 0{,}0012,$$

где m – масса пустого пикнометра, г;
m_1 – масса пикнометра с водой очищенной, г;
m_2 – масса пикнометра с жиром, г;
m_3 – масса пикнометра с жиром и водой, г.

Метод 3

Применяют для определения плотности жидкостей с точностью до ± 0,01 г/см^3 с помощью ареометра.

Испытуемую жидкость помещают в цилиндр и при температуре 20 ºС осторожно опускают в нее чистый сухой ареометр, на шкале которого предусмотрена ожидаемая величина плотности. Ареометр не должен касаться стенок и дна цилиндра. Через 3 – 4 мин после погружения ареометра производят отсчет по делению шкалы ареометра, соответствующему нижнему мениску жидкости (глаз должен быть на уровне мениска).

Примечания.

1.Определение плотности сильно летучих веществ ареометром не допускается.

2. В случае определения плотности темноокрашенных жидкостей отсчет производят по верхнему мениску.

Метод 4

Применяют для определения плотности жидкостей и газов в малом объеме (1 – 2 мл) с точностью до ± 0,0001 г/см^3 с помощью плотномера.

Принцип измерения плотности плотномером основан на определении периода колебаний U-образной измерительной трубки определенного объема, вызываемых электромагнитным генератором.

Частота собственных колебаний трубки зависит от ее конструктивных особенностей (упругости и массы) и определяется в процессе калибровки при заполнении ее веществом с известной плотностью. При заполнении трубки испытуемым веществом частота колебаний трубки меняется в зависимости от массы (плотности) вещества. Измеряемый специальным датчиком период колебаний измерительной трубки автоматически пересчитывается на плотность образца в г/см^3.

Вязкость	**ОФС.1.2.1.0015.15** **Взамен ГФ X** **Взамен ст. ГФ XI, вып. 1** **Взамен ГФ XII, ч.1, ОФС 42-0038-07**

Вязкость (внутреннее трение) – свойство текучих тел оказывать сопротивление перемещению одной их части относительно другой.

Основными кинематическими переменными для жидкостей служат деформация и ее скорость. Поэтому для изучения реологических характеристик жидких сред устанавливают связь между приложенными внешними нагрузками и кинематическими параметрами.

Жидкости, вязкость которых не зависит от напряжения сдвига и при определенной концентрации и температуре является постоянной величиной в соответствии с законом Ньютона, называются ньютоновскими. Жидкости, вязкость которых не подчиняется закону Ньютона и зависит от напряжения сдвига, называются неньютоновскими.

Различают *динамическую, кинематическую, относительную, удельную, приведенную и характеристическую* вязкости. Для неньютоновских жидкостей, главным образом, характерна *структурная вязкость*. *Структурная (эффективная или кажущаяся) вязкость* – вязкость при данном напряжении сдвига.

Динамическая вязкость или коэффициент вязкости (η) – это приходящаяся на единицу поверхности тангенциальная сила, называемая также *напряжением сдвига* (τ), выраженная в паскалях (Па), которую необходимо приложить для того, чтобы переместить слой жидкости площадью 1 $м^2$ со скоростью (v) 1 метр в секунду ($м \cdot с^{-1}$), находящийся на

расстоянии *(x)* 1 м относительно другого слоя, параллельно плоскости скольжения.

Величина *dv/dx* представляет собой градиент скорости и определяет скорость сдвига *D,* выраженную в обратных секундах ($с^{-1}$).

Таким образом, вязкость (η) определяется отношением напряжения сдвига (τ) к скорости сдвига *D* и определяется по формуле:

$$\eta = \tau / D. \qquad (1)$$

Динамическая вязкость (η) в системе СИ выражается в Паскаль-секундах (Па · с) или миллипаскаль-секундах (мПа · с); в системе СГС – в пуазах (П) или сантипуазах (сП). Также динамическая вязкость может измеряться в дин · с/$см^2$ и кгс · с/$м^2$ и производных от них единицах.

При измерении вязкости ньютоновских жидкостей в капиллярных вискозиметрах определяют кинематическую вязкость.

Кинематическую вязкость (ν), выраженную в метрах квадратных на секунду ($м^2 \cdot с^{-1}$), получают делением величины динамической вязкости η на плотность жидкости ρ, выраженную в килограммах на метр кубический (кг · $м^{-3}$), измеренную пикнометром или плотномером при той же температуре:

$$\nu = \eta / \rho . \qquad (2)$$

Кинематическая вязкость в системе СИ выражается в метрах квадратных на секунду ($м^2 \cdot с^{-1}$) или миллиметрах квадратных на секунду ($мм^2 \cdot с^{-1}$); в системе СГС – в стоксах (Ст) или сантистоксах (сСт).

При работе с растворами используются такие реологические характеристики, как относительная, удельная, приведенная и характеристическая вязкости.

Относительная вязкость ($\eta_{отн.}$) – отношение вязкости раствора к вязкости растворителя:

$$\eta_{отн} = \eta / \eta_0 .$$

Часто вязкость выражают как удельную вязкость ($\eta_{уд}$), которая показывает, какая часть вязкости раствора обусловлена присутствием в нем

растворенного вещества:

$$\eta_{уд} = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0} = \frac{\eta}{\eta_0} - 1 = \eta_{отн} - 1, \qquad (3)$$

где η – вязкость раствора;
η_o – вязкость растворителя.

Удельная вязкость, отнесенная к единице концентрации раствора, называется *приведенной вязкостью* ($\eta_{прив}$):

$$\eta_{прив} = \frac{\eta_{уд}}{c} \quad (4)$$

где c – концентрация раствора.

Для растворов полимеров вязкость является функцией молекулярных масс, формы, размеров и гибкости макромолекул. Чтобы определить структурные характеристики полимеров, приведенную вязкость экстраполируют к нулевой концентрации. В этом случае вводится понятие *характеристической вязкости* [η]:

$$[\eta] = \lim_{c \to 0} \eta_{прив} = \lim_{c \to 0} \frac{\eta_{уд}}{c}. \qquad (5)$$

Характеристическая вязкость выражается в единицах, обратных единицам концентрации.

Для определения вязкости применяются *капиллярные, ротационные вискозиметры и вискозиметры с падающим шариком.*

Капиллярные вискозиметры обычно используются для определения вязкости при одном значении скорости сдвига, поэтому применяются в основном для исследования ньютоновских жидкостей. Они просты и удобны в обращении.

Ротационные вискозиметры позволяют определять реологические свойства жидкостей в широком диапазоне скоростей сдвига, что особенно важно для неньютоновских жидкостей.

Вискозиметр с падающим шариком (вискозиметр Гепплера) предназначен для измерения вязкости прозрачных ньютоновских жидкостей.

Допускается использование других вискозиметров при условии, что точность и правильность измерений будет не хуже, чем в случае использования вискозиметров, описанных ниже.

Измерение вязкости на капиллярных вискозиметрах

Для измерения кинематической вязкости применяются капиллярные вискозиметры типа Оствальда и Уббелоде различной модификации.

Стеклянные капиллярные вискозиметры предназначены для определения вязкости:

1) прозрачных жидкостей – серии ВПЖ и ВПЖТ;

2) малых объемов прозрачных жидкостей – серии ВПЖМ и ВПЖТМ;

3) непрозрачных жидкостей – серии ВНЖ и ВНЖТ.

На рис. 1 и 2 представлен общий вид вискозиметров серии ВПЖ.

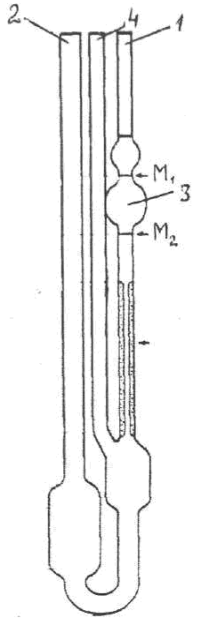


Рисунок 1 – Вискозиметр стеклянный капиллярный ВПЖ-1
1, 2, 4 – трубки; 3 – измерительный резервуар;
M_1, M_2 – отметки измерительного резервуара.

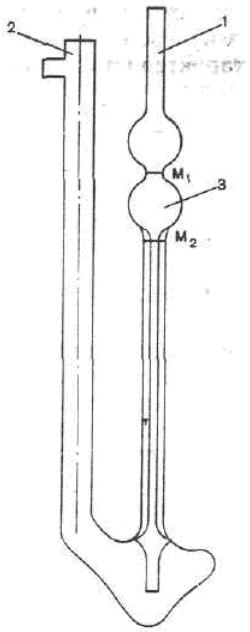


Рисунок 2 – Вискозиметр стеклянный капиллярный ВПЖ-2

1, 2 – трубки; 3 – измерительный резервуар;
M_1, M_2 – отметки измерительного резервуара.

Вискозиметр состоит из капилляра с радиусом R и длиной L, через который под действием силы тяжести протекает жидкость объема V.

Если H – средняя высота жидкости, g – ускорение силы тяжести, то кинематическая вязкость (ν) в миллиметрах в квадрате на секунду ($мм^2 \cdot с^{-1}$) равна:

$$\nu = \frac{\eta}{\rho} = \frac{\pi \cdot R^4 \cdot g \cdot H}{8 \cdot L \cdot V} \cdot t = K \cdot t, \quad (6)$$

где $K = \frac{\pi \cdot R^4 \cdot g \cdot H}{8 \cdot L \cdot V}$ – постоянная прибора, обычно выражаемая в миллиметрах в квадрате на секунду в квадрате ($мм^2 \cdot с^{-2}$).

Если известна плотность испытуемой жидкости ρ, то, зная ν, можно вычислить динамическую вязкость η (мПа · с):

$$\eta = \rho \cdot \nu = \rho \cdot K \cdot t, \quad (7)$$

где ρ – плотность испытуемой жидкости ($мг \cdot мм^{-3}$), полученная умножением относительной плотности (d_{20}^{20}) на 0,9982.

Для определения вязкости в каждом конкретном случае капиллярные вискозиметры выбирают в соответствии с табл. 1 и 2 по известным значениям K и V в зависимости от характера испытуемой жидкости, ее объема и значения вязкости.

Методика. Перед проведением измерений вискозиметр следует тщательно промыть и высушить.

В колено трубки 2 вискозиметра наливают измеренный объем жидкости и вискозиметр помещают в вертикальном положении в водяной термостат с температурой (20 ± 0,1) °С, если в фармакопейной статье не указана другая температура, удерживая его в этом положении не менее 30 мин для установления температурного равновесия. Производят повышение уровня жидкости в вискозиметре через отверстие 1 (в случае вискозиметра ВПЖ-1 закрывают трубку 4) до тех пор, пока жидкость не поднимется выше отметки M_1. Тогда повышение уровня прекращают, и жидкость опускается. Время t, которое требуется, чтобы мениск прошел расстояние между отметками M_1 и M_2, замеряют секундомером с точностью до 0,2 с.

Время истечения испытуемой жидкости определяют как среднее не менее чем трех измерений. Полученные данные являются приемлемыми при условии, что результаты двух последовательных измерений отличаются не более чем на 1 %.

Для определения относительной вязкости жидкости $\eta_{отн}$ измеряют время истечения между верхней и нижней меткой мениска той жидкости, относительно которой проводят измерения $t_{оср}$. Затем в том же чистом и сухом вискозиметре при тех же условиях определяют время истечения испытуемой жидкости $t_{ср.}$.

Одновременно при той же температуре, при которой определяют вязкость, измеряют плотности испытуемых жидкостей ρ_o и ρ пикнометрическим методом и рассчитывают относительную вязкость по формуле:

$$\eta_{отн} = \frac{t_{ср} \cdot \rho}{t_{оср} \cdot \rho_0}. \qquad (8)$$

Для определения характеристической вязкости готовят не менее 5 испытуемых растворов различной концентрации. При этом должно выполняться условие возможности линейной экстраполяции приведенной вязкости к нулевой концентрации, т.е. концентрации раствора следует выбирать минимальными в пределах чувствительности и точности метода измерения. Для каждой концентрации раствора определяют $t_{ср.}$ и рассчитывают приведенную вязкость. Затем строят зависимость $\eta_{прив.}$ от концентрации c и графически или линейным методом наименьших квадратов экстраполируют приведенную вязкость к нулевой концентрации, т.е. находят характеристическую вязкость.

Таблица 1 – Характеристики капиллярных вискозиметров серии ВПЖ-1 и ВПЖТ-1

Номинальное значение постоянной *K*, мм^2/с^2	**Диапазон измерения вязкости, мм^2/с (включительно)**	**Диаметр капилляра, мм**				**Объем измерительного резервуара V, см^3**	
		ВПЖ-1		**ВПЖТ-1**			
		Номинальный	**Предельное отклонение**	**Номинальный**	**Предельное отклонение**	**ВПЖ-1**	**ВПЖТ-1**
0,003	от 0,6 до 3	0,34	± 0,02	0,34	+ 0,007	1,5 ± 0,2	1,5 ± 0,08
0,01	от 2 до 10	0,54		0,54	± 0,01	3 ± 0,3	3,0 ± 0,15
0,03	от 6 до 30	0,86	± 0,03	0,86	± 0,02	6,2 ± 0,3	6,2 ± 0,30
0,1	от 20 до 100.	1,16		1,16			
0,3	от 60 до 300	1,52	± 0,04	1,52	± 0,03		
1	от 200 до 1000	2,10		—	—		—
3	от 600 до 3000	2,75		—	—		
10	от 2000 до 10 000	3,75	± 0,05	—	—		
30	от 6000 до 30 000	5,10		—	—		
100	от 20 000 до 100 000	6,85	± 0,06	—	—		

Таблица 2 Характеристики капиллярных вискозиметров серии ВПЖ-2 и ВПЖТ-2

Номинальное значение постоянной К, мм^2/с^2	**Диапазон измерения вязкости, мм^2/с (включительно)**	**Диаметр капилляра, мм**				**Объем измерительного резервуара *V*, см^3**	
		ВПЖ-2		**ВПЖТ-2**			
		Номинальный	**Предельное отклонение**	**Номинальный**	**Предельное отклонение**	**ВПЖ-2**	**ВПЖТ-2**
0,003	от 0,6 до 3.	0,34	± 0,02	0,34	± 0,007	1,5 ± 0,2	1,5 ± 0,08
0,005	от 1 до 5	0,39		0,39	± 0,008		
0,01	от 2 до 10	0,56		0,56	± 0,01	3,8 ± 0,3	3,8 ± 0,2
0,03	от 6 до 30.	0,73		0,73			
0,1	от 20 до 100	0,99	± 0,03	0,99	± 0,02		
0,3	от 60 до 300	1,31	± 0,04	1,31	± 0,03		
1	от 200 до 1000	1,77		1,77			
3	от 600 до 3000	2,37		—	—		—
10	от 2000 до 10 000	3,35	± 0,05	—	—		
30	от 6000 до 30 000	4,66		—	—		

Измерение вязкости на ротационных вискозиметрах

Ротационные вискозиметры обычно используют для измерения динамической вязкости. Ротационные вискозиметры различаются по типу измерительных систем: коаксиальные (соосные) цилиндры, конус-плоскость, плоскость-плоскость.

Ротационные вискозиметры представляют собой системы, в которых осуществляется сдвиговое течение жидкости (рис. 3).

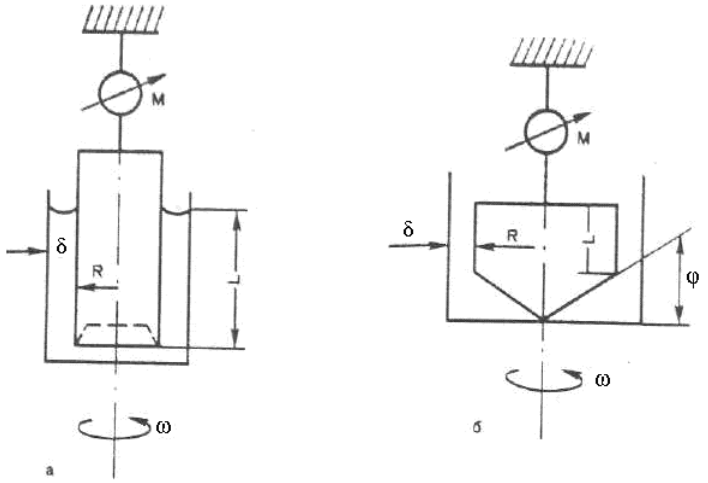


Рисунок 3 – Геометрия ротационных вискозиметров

а. Вискозиметр с концентрическим цилиндром:
M – момент сопротивления; R – радиус внутреннего цилиндра;
δ – внешний цилиндр; L – высота испытуемой жидкости;
ω – угловая скорость вращения внутреннего цилиндра.

б. Вискозиметр с системой конус – плоскость:
M – момент сопротивления; R – радиус конуса;
φ – угол конуса; L –высота цилиндрической части конуса;
ω – угловая скорость вращения конуса.

Принцип действия наиболее часто используемых ротационных вискозиметров заключается в измерении силы вращения ротора (крутящий момент) при его вращении с постоянной угловой скоростью (скорость вращения) в жидкости, расположенной между двумя коаксиальными цилиндрами, один из которых вращается двигателем, а второй стационарный.

Ротационные вискозиметры применяются для измерения вязкости ньютоновских (вязкость, независящая от сдвига) или неньютоновских

жидкостей (вязкость, зависящая от сдвига, или кажущаяся вязкость). При измерении вязкости (структурной, эффективной или кажущейся) определяется момент силы М (крутящий момент), выраженный в ньютон-метрах (Н·м), который пропорционален углу, на который поворачивается внутренний цилиндр.

Ротационные вискозиметры подразделяются на две группы: абсолютные и относительные вискозиметры. В абсолютных вискозиметрах поток жидкости в измеряемой форме вполне определенный. Измерения приводят к значениям абсолютной вязкости, которые можно сравнить с любыми другими абсолютными значениями. В относительных вискозиметрах поток жидкости в измеряемой форме не вполне определен. Измерения приводят к значениям относительной вязкости, которые нельзя сравнить с любыми другими абсолютными значениями или другими относительными значениями, если они не определены с помощью того же метода относительной вискозиметрии.

Для заданных диапазонов вязкости предназначены различные измерительные системы, а также различные скорости вращения.

ПРИБОРЫ

Наиболее распространены следующие типы приборов.

Вискозиметры с концентрическим цилиндром (абсолютные вискозиметры)

В вискозиметрах с концентрическими цилиндрами (вискозиметр с коаксильным двойным цилиндром или вискозиметр с простым коаксильным цилиндром) вязкость определяется путем помещения жидкости в промежуток между внешним и внутренним цилиндром.

В случае ламинарного потока, динамическую вязкость η, выраженную в паскаль-секундах (Па·с), рассчитывают по формуле:

$$\eta = \frac{1}{\omega} \cdot \left\{\frac{M}{4 \cdot \pi \cdot h}\right\} \cdot \left\{\frac{1}{R_A^2} - \frac{1}{R_B^2}\right\} = K \cdot \frac{M}{\omega}, \qquad (9)$$

где M – крутящий момент на поверхности цилиндра, Н · м;

h – глубина погружения внутреннего цилиндра в жидкую среду, м;
R_A – радиус внутреннего из цилиндра, м;
R_B – радиус внешнего из цилиндра, м;
ω – угловая скорость, рад/с;
K – постоянная вискозиметра, рад/м^3.

Вискозиметры с системой конус – плоскость (абсолютные вискозиметры)

В вискозиметрах с системой конус – плоскость исследуемая жидкость вводится в просвет между плоским диском и конусом, образуя определенный угол. Измерения вязкости выполняют путем вращения конуса или плоского диска.

В случае ламинарного потока, динамическую вязкость η, выраженную в паскальсекундах (Па·с), рассчитывают по формуле:

$$\eta = \left\{\frac{M}{\omega}\right\} \cdot \left\{\frac{3\alpha}{2\pi R^2}\right\} = K \cdot \frac{M}{\omega}, \qquad (10)$$

где M – крутящий момент на поверхности цилиндра, Н · м;
R – радиус конуса, м;
ω – угловая скорость, рад/с;
α – угол между плоским диском и конусом, рад;
K – постоянная вискозиметра, рад/м^3.

Вискозиметр со шпинделем (относительные вискозиметры)

В вискозиметрах со шпинделем вязкость определяют путем вращения шпинделя (цилиндрического или в форме диска). Относительные значения вязкости (или кажущейся вязкости) могут быть рассчитаны непосредственно с использованием преобразующих факторов из показаний для данной скорости вращения.

Постоянная вискозиметра K может быть определена при разных скоростях вращения с использованием градуировочных жидкостей для калибровки вискозиметров.

При этом вязкость рассчитывается по формуле:

$$\eta = K \cdot \frac{M}{\omega}, \qquad (11)$$

где M – крутящий момент на поверхности цилиндра, Н · м;

ω – угловая скорость, рад/с;
K – постоянная вискозиметра, рад/м^3.

Выпускаемые приборы сопровождаются таблицами, в которых приведена постоянная вискозиметра в зависимости от площади поверхности используемого цилиндра и скорости его вращения.

Вязкость измеряют в соответствии с инструкцией по применению ротационного вискозиметра.

Условия определения вязкости на ротационном вискозиметре указывают в фармакопейной статье на лекарственное средство. К ним относятся:

- модель вискозиметра;
- температура, при которой проводится исследование;
- тип измерительной системы;
- угловая скорость (число оборотов шпинделя) или скорость сдвига;
- размер контейнера для испытуемого образца лекарственного средства;
- объем испытуемого образца лекарственного средства.

Измерение вязкости на вискозиметре с падающим шариком

Измерение вязкости путем определения скорости падения шарика в жидкости проводят с помощью вискозиметра Гепплера (рис. 4).

На рис. 4 показан общий вид вискозиметра с падающим шариком. В комплект вискозиметра входят шарики с диаметром от 10,00 до 15,80 мм, что обеспечивает измерение динамической вязкости градуировочных жидкостей в диапазоне от 0,6 до $8 \cdot 10^4$ мПа·с.

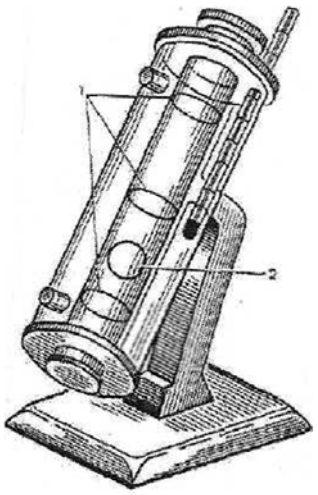


Рисунок 4 – Вискозиметр с падающим шариком

1 – калибровочные отметки; 2 – шарик.

Методика. Для измерения вязкости испытуемую жидкость заливают в трубку, опускают шарик и термостатируют вискозиметр в течение примерно 30 мин при температуре (20 ± 0,1) °С, если не указано иначе в фармакопейной статье. Далее шарик ставят в исходное положение. Включают секундомер, когда нижняя часть шарика коснется верхней метки, и останавливают, когда шарик достигнет нижней метки. Время движения шарика измеряют не менее 5 – 7 раз. При этом разность между наибольшим и наименьшим значениями времени движения шарика не должна превышать 0,5 % от его среднего значения.

Динамическую вязкость испытуемой жидкости вычисляют по формуле:

$$\eta = K \cdot (\rho_{ш.} - \rho_{ж.}) \cdot t_{ср.}, \quad (12)$$

где η – динамическая вязкость, мПа · с;
K – постоянная вискозиметра;
$\rho_{ш.}$ и $\rho_{ж.}$ – плотности шарика и жидкости соответственно, г/см^3;
$t_{ср.}$ – среднее время движения шарика между крайними метками, с.

Постоянная вискозиметра (K) определяется по формуле:

$$K = \frac{\eta_0}{(\rho_{ш} - \rho_{0ж}) \cdot t_{0ср}}, \quad (13)$$

где η_0 – динамическая вязкость градуировочной жидкости, мПа · с ;
$\rho_{ш}$ и $\rho_{0ж}$ – плотности шарика и градуировочной жидкости

соответственно, г/см^3;

$t_{0ср}$ – среднее значение времени движения данного шарика в градуировочной жидкости, с.

Число постоянных вискозиметра соответствует числу шариков, входящих в комплект вискозиметра.

При необходимости постоянные прибора могут быть проверены по вышеуказанной формуле с помощью градуировочных жидкостей с известными значениями динамической вязкости. Плотность шариков $\rho_ш$ вычисляют по формуле:

$$\rho_ш = \frac{6 \cdot m}{\pi \cdot d^3}, \qquad (14)$$

где m – масса шарика, определяемая взвешиванием, г;

d – диаметр шарика, см.

Перед проведением измерений вискозиметр следует тщательно промыть и высушить.

Определение спирта этилового в лекарственных средствах	**ОФС.1.2.1.0016.15** **Взамен ГФ X** **Взамен ГФ XI, вып. 1** **Взамен ГФ XII, ч.1,** **ОФС 42-0039-07**

Требование данной статьи распространяются на субстанции (настойки матричные гомеопатические, экстракты жидкие и др.) и лекарственные препараты, представленные в жидких лекарственных формах (настойки, экстракты, растворы спиртовые и др.), содержащие в своем составе спирт этиловый. Спирт этиловый в лекарственных средствах в зависимости от их состава и физико-химических свойств, может быть определен одним из следующих методов: дистилляцией или газовой хроматографией. Метод количественного определения спирта этилового должен быть указан в фармакопейной статье или нормативной документации на лекарственное средство..

Метод дистилляции

Данный метод заключается в отгонке спирта этилового от растворенных в нем веществ. Прибор для определения спирта этилового в жидких фармацевтических препаратах методом дистилляции представлен на рисунке 1.

В круглодонную колбу (*1*) (рисунок) вместимостью 200 – 250 мл вносят точно отмеренное количество препарата. При содержании спирта в препарате до 20 % для определения берут 75 мл препарата, при содержании от 20 до 50 % – 50 мл, при содержании от 50 % и выше 25 мл; перед

перегонкой препарат разбавляют водой до 75 мл.

Колбу присоединяют к горизонтально расположенному прямому холодильнику с аллонжем (*4*), направляющим дистиллят в приемник – мерную колбу вместимостью 50 мл (*5*), желательно помещенную в стакан с холодной водой.

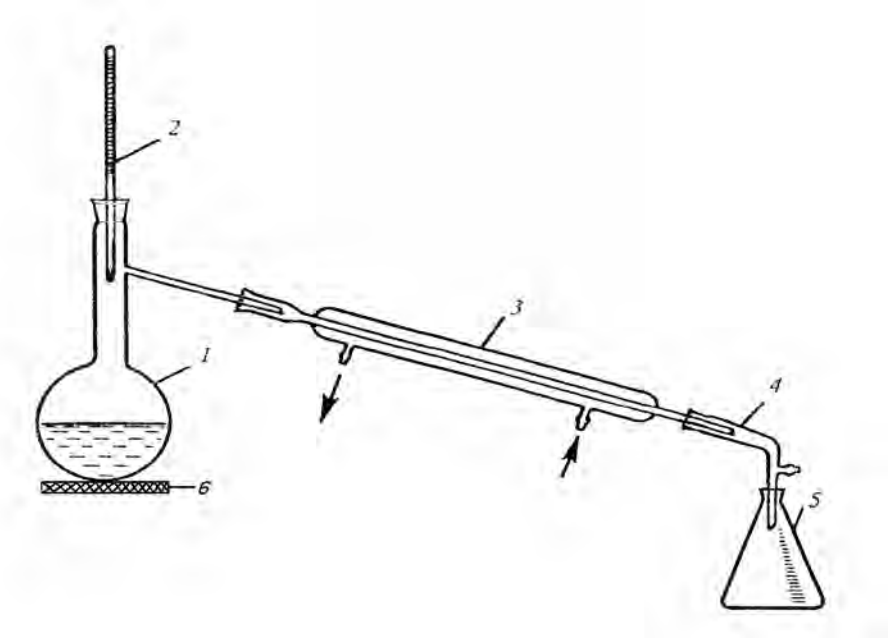


Рисунок – Прибор для определения содержания спирта этилового

1 – круглодонная колба; *2* – термометр; *3* – холодильник;
4 – аллонж; *5* – приемник; *6* – электронагреватель.

Нагревают перегонную колбу на электронагревателе (*6*). Для равномерного кипения в колбу с испытуемым раствором помещают капилляры, пемзу или кусочки прокаленного фарфора. Температуру паров измеряют термометром (*2*), размещенным в приборе таким образом, чтобы ртутный шарик располагался на 0,5 – 1,0 см ниже отверстия отводной трубки. При соблюдении температурных пределов перегонки достигается равномерное кипение испытуемого раствора. Если испытуемый раствор при перегонке сильно пенится, то прибавляют 2 – 3 мл концентрированной фосфорной или серной кислоты, кальция хлорид, парафин, воск (2 – 3 г).

Собирают около 48 мл отгона, охлаждают его до температуры 20 ºС, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Отгон может быть прозрачным или слегка мутным.

Определяют плотность отгона пикнометром и по алкоголеметрическим таблицам находят содержание спирта в объемных процентах.

Содержание спирта в препарате в объемных процентах (X, % (о/о)) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{50 \cdot a}{b}, \qquad (1)$$

где 50 – объем отгона, мл;

a – содержание спирта в отгоне, % (о/о);

b – объем испытуемого препарата, взятый для перегонки, мл.

Если препарат содержит летучие вещества, то его предварительно обрабатывают.

При содержании в препарате эфирных масел, хлороформа, этилового эфира, камфоры к нему добавляют в делительной воронке равные объемы насыщенного раствора натрия хлорида и петролейного эфира. Смесь взбалтывают в течение 3 мин. После разделения слоев спиртоводный слой сливают в другую делительную воронку и обрабатывают таким же образом половинным количеством петролейного эфира. Спиртоводный слой сливают в колбу для перегонки. Объединенные эфирные извлечения взбалтывают с половинным количеством насыщенного раствора натрия хлорида, а потом присоединяют к жидкости, находящейся в колбе для перегонки.

Если препарат содержит менее 30 % спирта, то высаливание проводят не раствором, а 10 г сухого натрия хлорида.

При содержании в препарате летучих кислот их нейтрализуют раствором щелочи, а при содержании летучих оснований – фосфорной или серной кислотами.

Препараты, содержащие свободный йод, перед дистилляцией обрабатывают до обесцвечивания цинковой пылью или рассчитанным количеством сухого натрия тиосульфата. Для связывания летучих сернистых соединений к препарату прибавляют несколько капель 10 % раствора натрия гидроксида.

Метод газовой хроматографии

Если нет других указаний в фармакопейной статье, для проведения анализа используют газовый хроматограф с пламенно-ионизационным детектором и с хроматографической колонкой размером 150 × 0,4 см, заполненной полимерным сорбентом Porapak Q с размером частиц 100 – 120 меш.

Температура колонки – 150 ºС; температура испарителя – 170 ºС; температура детектора – 170 ºС. Скорость газа-носителя (азот или гелий) – 30 мл/мин.

Испытуемый раствор. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают точно отмеренное количество испытуемого препарата, достаточное для получения раствора, содержащего 4 – 6 % этанола по объему, прибавляют 5,0 мл пропанола (внутренний стандарт), перемешивают, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. 10,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Раствор стандартного образца. В мерную колбу вместимостью 100 мл вносят 5,0 мл спирта этилового не менее 95 % (стандартный образец) и 5,0 мл пропанола (внутренний стандарт), доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. 10,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

В испаритель газового хроматографа, выведенного на рабочий режим, вводят последовательно по 1 – 2 мкл испытуемого раствора и раствора стандартного образца и регистрируют хроматограммы.

Содержание спирта этилового в препарате в объемных процентах (*X,* % (о/о)) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{S \cdot S'_{о} \cdot 5{,}0 \cdot P}{S_{о} \cdot S' \cdot V_{пр}}, \qquad (2)$$

где S и S' – площади пика спирта этилового на хроматограммах

анализируемого раствора и раствора стандартного образца соответственно;

S_o и S'_o – площади пика пропанола на хроматограммах испытуемого раствора и раствора стандартного образца соответственно;

$V_{пр}$ – объем препарата, взятый для анализа, мл;

P – содержание спирта этилового в стандартном образце, %.

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

Проверка пригодности хроматографической системы. Система считается пригодной, если:

– разрешение (R) пиков спирта этилового и пропанола не менее 2,0;

– фактор асимметрии (T) пика спирта этилового не превышает 1,5;

– относительное стандартное отклонение (RSD) не превышает 2 % относительно площади пика спирта этилового к площади пика внутреннего стандарта.

Рефрактометрия **ОФС.1.2.1.0017.15**

Взамен ГФ X

Взамен ГФ XI, вып. 1

Взамен ГФ XII, ч. 1, ОФС 42-0040-07

Рефрактометрия – метод анализа лекарственных средств, основанный на определении показателя преломления испытуемого вещества.

Показателем преломления (индексом рефракции) называют отношение скорости света в вакууме к скорости света в испытуемом веществе (абсолютный показатель преломления). На практике определяют так называемый относительный показатель преломления (n), который является отношением скорости света в воздухе к скорости света в испытуемом веществе.

Показатель преломления зависит от температуры и длины волны света, при которой проводят определение. В растворах показатель преломления зависит также от концентрации вещества и природы растворителя.

Рефрактометрию применяют для установления подлинности и чистоты вещества. Метод применяют также для определения концентрации вещества в растворе, которую находят по графику зависимости показателя преломления раствора от концентрации раствора. На графике выбирают интервал концентраций, в котором наблюдается линейная зависимость между показателем преломления и концентрацией. В этом интервале концентрацию испытуемого раствора (X, %) вычисляют по формуле:

$$X = (n - n_o)/F,$$

где n – показатель преломления испытуемого раствора;

n_o – показатель преломления растворителя при той же

температуре;

F – фактор, равный величине прироста показателя преломления при увеличении концентрации испытуемого раствора на 1 % (устанавливается экспериментально).

Для определения показателя преломления применяют рефрактометры. Определение проводят при температуре (20 ± 0,5) ºС и длине волны линии D спектра натрия (589,3 нм). Показатель преломления, определенный при таких условиях, обозначается индексом n^{20}_D.

Современные приборы откалиброваны таким образом, что отсчеты, полученные по их шкалам, соответствуют показателям преломления для D линии спектра натрия. При проведении измерений следует соблюдать указания в отношении соответствующего источника света, приведенные в инструкции к прибору. Если используют белый свет, то рефрактометр снабжен компенсирующей системой.

Цена деления термометра не должна превышать 0,5 ºС.

Обычно измерения показателя преломления проводят на рефрактометрах Аббе, в основу которых положено явление полного внутреннего отражения при прохождении светом границы раздела двух сред с разными показателями преломления. Диапазон измеряемых показателей преломления при измерении в проходящем свете 1,3 – 1,7. Точность измерения показателя преломления должна быть не ниже $\pm (2 \cdot 10^{-4})$.

Могут быть использованы рефрактометры других типов с такой же или большей точностью.

Рефрактометры юстируют по эталонным жидкостям, значения показателей преломления которых обозначены на этикетке, или по дистиллированной воде, для которой $n^{20}_D = 1{,}3330$ и $n^{25}_D = 1{,}3325$ ($\Delta n/\Delta = -0{,}000085$).

Поляриметрия **ОФС.1.2.1.0018.15**

Оптическое вращение – свойство вещества вращать плоскость поляризации при прохождении через него поляризованного света.

В зависимости от природы оптически активного вещества вращение плоскости поляризации может иметь различное направление и величину. Если от наблюдателя, к которому направлен свет, проходящий через оптически активное вещество, плоскость поляризации вращается по часовой стрелке, то вещество называют правовращающим и перед его названием ставят знак (+); если же плоскость поляризации вращается против часовой стрелки, то вещество называют левовращающим и перед его названием ставят знак (–).

Величину отклонения плоскости поляризации от начального положения, выраженную в угловых градусах, называют углом вращения и обозначают греческой буквой α. Величина угла вращения зависит от природы оптически активного вещества, длины пути поляризованного света в оптически активной среде (чистом веществе или растворе) и длины волны света. Для растворов величина угла вращения зависит от природы растворителя и концентрации оптически активного вещества. Величина угла вращения прямо пропорциональна длине пути света, т. е. толщине слоя оптически активного вещества или его раствора. Влияние температуры в большинстве случаев незначительно.

Для сравнительной оценки способности различных веществ вращать плоскость поляризации света вычисляют величину удельного вращении [α].

Удельное оптическое вращение $[\alpha]_D^{20}$ представляет собой угол вращения α плоскости поляризации монохроматического света при длине волны линии *D* спектра натрия (589,3 нм), выраженный в градусах, измеренный при температуре 20 ºС, рассчитанный для толщины слоя испытуемого вещества 1 дм и приведенный к концентрации вещества, равной 1 г/мл. Выражается в градус-миллилитрах на дециметр-грамм [(º) · мл · дм$^{-1}$ · г$^{-1}$].

Иногда для измерения используют зеленую линию спектра ртути с длиной волны 546,1 нм.

При определении [α] в растворах оптически активного вещества необходимо иметь в виду, что найденная величина может зависеть от природы растворителя и концентрации оптически активного вещества.

Замена растворителя может привести к изменению [α] не только по величине, но и по знаку. Поэтому, приводя величину удельного вращения, необходимо указывать растворитель и выбранную для измерения концентрацию раствора.

Удельное вращение определяют в пересчете на сухое вещество или из высушенной навески, что должно быть указано в фармакопейной статье.

Измерение угла вращения проводят на поляриметре, позволяющем определить величину угла вращения с точностью ± 0,02 ºС при температуре (20 ± 0,5) ºС. Измерения оптического вращения могут проводиться и при других значениях температуры, но в таких случаях в фармакопейной статье должен быть указан способ учета температуры. Шкалу обычно проверяют при помощи сертифицированных кварцевых пластинок. Линейность шкалы может быть проверена при помощи растворов сахарозы.

Оптическое вращение растворов должно быть измерено в течение 30 мин с момента их приготовления; растворы или жидкие вещества должны быть прозрачными. При измерении прежде всего следует установить нулевую точку прибора или определить величину поправки с трубкой, заполненной чистым растворителем (при работе с растворами), или с пустой

трубкой (при работе с жидкими веществами). После установки прибора на нулевую точку или определения величины поправки проводят основное измерение, которое повторяют не менее 3 раз.

Для получения величины угла вращения α показания прибора, полученные при измерениях, алгебраически суммируют с ранее найденной величиной поправки.

Величину удельного вращения [α] рассчитывают по одной из следующих формул.

Для веществ, находящихся в растворе:

$$[\alpha] = \frac{\alpha \cdot 100}{l \cdot c}, \qquad (1)$$

где α – измеренный угол вращения, градусы;
l – толщина слоя, дм;
c – концентрация раствора, г вещества на 100 мл раствора.

Для жидких веществ:

$$[\alpha] = \frac{\alpha}{l \cdot \rho}, \qquad (2)$$

где α – измеренный угол вращения, градусы;
l – толщина слоя, дм;
ρ – плотность жидкого вещества, г/мл.

Измерение величины угла вращения проводят также для оценки чистоты оптически активного вещества или для определения его концентрации в растворе. Для оценки чистоты вещества по уравнению (1) или (2) рассчитывают величину его удельного вращения [α]. Концентрацию оптически активного вещества в растворе находят по формуле:

$$c = \frac{\alpha \cdot 100}{[\alpha] \cdot l}. \qquad (3)$$

Поскольку величина [α] постоянна только в определенном интервале концентраций, возможность использования формулы (3) ограничивается этим интервалом.

При описании в фармакопейной статье угла вращения указывают измеренную величину в градусах, концентрацию раствора для которого проводились измерения, растворитель и длину кюветы.

При описании в фармакопейной статье удельного вращения указывают рассчитанную величину без указания размерности, концентрацию раствора для которого проводились измерения и растворитель.

Амперометрическое титрование	**ОФС.1.2.1.19.0001.15**
	Взамен ст. ГФ XI, вып.1

Амперометрическое титрование является методом количественного анализа, при котором конечная точка титрования определяется по изменению тока между погруженными в анализируемый раствор электродами в зависимости от количества прибавляемого титранта. Один из электродов – индикаторный, второй – электрод сравнения, обладающий постоянным потенциалом. Напряжение, накладываемое на электроды, должно быть таким, чтобы потенциал индикаторного электрода обеспечивал предельный диффузионный ток, обусловленный разрядом электрохимически активных соединений, участвующих в титриметрической реакции.

Разновидностью метода является использование пары идентичных индикаторных электродов небольшой поверхности (обычно платиновые или золотые), находящихся под напряжением, достаточным для протекания катодного и анодного процессов при наличии в растворе окислительно-восстановительной пары. Это вид титрования рекомендуется при йодометрическом и нитритометрическом определении, а также при определении воды по методу К. Фишера.

Оборудование. Прибор для амперометрического титрования состоит из источника постоянного тока с регулируемым напряжением, микроамперметра и электродной пары. В качестве индикаторного электрода

обычно используют инертные электроды – платиновый, золотой, ртутный капельный, графитовый или стеклоуглеродный, а также сделанный из этих материалов вращающийся дисковый электрод. В качестве электрода сравнения обычно используют каломельный или хлорсеребряный электрод.

При титровании в средах с большим сопротивлением может использоваться трехэлектродная схема. Напряжение накладывается на индикаторный и вспомогательный электроды, а требуемый потенциал индикаторного электрода устанавливается относительно электрода сравнения.

Методика. При амперометрическом титровании устанавливают потенциал индикаторного электрода, обеспечивающий протекание электрохимической реакции, и регистрируют величину тока в зависимости от количества прибавленного титранта. Титрование продолжают после достижения предполагаемой точки эквивалентности. По меньшей мере, три точки с двух сторон от точки эквивалентности должны лежать на прямой. Конечная точка титрования является точкой пересечения двух прямых.

При амперометрическом титровании с двумя индикаторными электродами регистрируют всю кривую титрования и используют для определения конечной точки титрования.

Перечень параметров, указываемых в фармакопейных статьях. Конкретные параметры – тип индикаторного электрода, потенциал индикаторного электрода (или разность потенциалов двух индикаторных электродов), электрод сравнения, массу анализируемого вещества, тип и концентрацию титранта – указывают в фармакопейных статьях.

Потенциометрическое титрование	**ОФС.1.2.1.19.0002.15** **Взамен ГФ X** **Взамен ст. ГФ XI, вып.1**

Потенциометрическое титрование является методом количественного анализа, при котором конечная точка титрования определяется по изменению потенциала индикаторного электрода в зависимости от количества прибавляемого титранта.

Оборудование. Потенциал индикаторного электрода обычно измеряют при нулевом или практически нулевом токе. Наиболее удобно использовать для этих целей высокоомный потенциометр (pH-метр).

В качестве индикаторного электрода при кислотно-основном титровании чаще всего используют стеклянный электрод, при окислительно-восстановительном титровании – платиновый электрод, в комплексонометрическом титровании – ионоселективный электрод, а в реакциях осаждения – серебряный или сульфидсеребряный электрод.

Второй электрод электродной пары, погруженной в анализируемый раствор, является электродом сравнения, обладающим постоянным потенциалом. Обычно в качестве электрода сравнения используют каломельный или хлорсеребряный электроды.

В случаях, когда ионы, диффундирующие из электрода сравнения, могут мешать титрованию, или при титровании в неводных средах, электрод сравнения отделяют от анализируемого раствора электролитическим

мостиком. Если титрование проводится при постоянном значении pH, в качестве электрода сравнения можно использовать стеклянный электрод.

Методика. При потенциометрическом титровании регистрируют потенциал индикаторного электрода относительно электрода сравнения в зависимости от количества прибавленного титранта, а титрование продолжают после достижения предполагаемой точки эквивалентности. Конечной точке титрования отвечает максимальное значение изменения потенциала (ΔE) к приращению объема прибавленного титранта (ΔV). Конечную точку титрования находят графически методом касательных по кривой зависимости потенциала индикаторного электрода от количества прибавленного титранта, или расчетным методом по максимальному значению $\Delta E/\Delta V$, или по точке разрыва (смене знака) второй производной $\Delta(\Delta E/\Delta V)$.

Перечень параметров, указываемых в фармакопейных статьях. Конкретные параметры – тип индикаторного электрода, электрод сравнения, массу анализируемого вещества, тип и концентрацию титранта – указывают в фармакопейных статьях.

Потенциометрическое титрование может быть автоматизировано с использованием автотитраторов, способных проводить математический анализ кривой титрования или останавливать прибавление титранта при достижении значения потенциала индикаторного электрода, отвечающего точке эквивалентности.

Электропроводность **ОФС.1.2.1.0020.15**

Вводится впервые

Электропроводность является мерой способности среды проводить электрический ток. Ток, текущий через проводник, прямо пропорционален приложенной электродвижущей силе и обратно пропорционален сопротивлению проводника. Электропроводность характеризуется величиной удельного объемного сопротивления, которая равняется сопротивлению кубического объёма среды с ребром в 1 см. Электропроводность по определению является величиной, обратной сопротивлению. Единицей сопротивления в международной системе СИ является Ом·м, на практике обычно выражается в Ом·см. Единицей электропроводности в международной системе СИ является См·м$^{-1}$ (сименс·м$^{-1}$) На практике электропроводность раствора выражается в См·см$^{-1}$ или в мкСм·см$^{-1}$.

Аппаратура. Используемая аппаратура (кондуктометр) служит для измерения сопротивления столба жидкости между электродами, погруженными в раствор (ячейка электропроводности). Ячейка электропроводности представляет собой сосуд с двумя параллельно расположенными платиновыми электродами, покрытыми платиновой чернью. Оба электрода обычно впаяны в стеклянную трубку. Могут быть использованы другие типы электродов. При измерении сопротивления используют переменный ток, чтобы избежать влияния поляризации электрода.

Электропроводность растворов существенно зависит от температуры. Если нет других указаний, измерения обычно проводят при температуре 20 °С. В таблице приведены значения электропроводности растворов калия хлорида при 20 °С.

Таблица – Электропроводность растворов калия хлорида при 20 °С

Концентрация калия хлорида, г/1000 г	**Электропроводность, мкСм ·см$^{-1}$**
0,7455	1330
0,0746	133,0
0,0149	26,6

Аппаратура снабжена термометром и температурным компенсатором.

Методика 1. Определение постоянной ячейки. Ячейку электропроводности выбирают таким образом, чтобы она соответствовала электропроводности испытуемого раствора. Чем больше ожидаемая электропроводность, тем более высокое значение постоянной ячейки должно быть выбрано (низкое сопротивление). Обычно используемые ячейки электропроводности имеют константы порядка 0,1, 1 и 10 см$^{-1}$. Для определения постоянной ячейки используют сертифицированные стандартные растворы (например, раствор калия хлорида), которые готовят в воде, свободной от диоксида углерода. Для ячеек, имеющих постоянную около 0,1 см$^{-1}$, могут использоваться другие сертифицированные стандарты.

Ячейку электропроводности несколько раз промывают водой, свободной от диоксида углерода, и 2 раза стандартным раствором, используемым для определения постоянной ячейки. Измерение сопротивления ячейки электропроводности проводят при температуре (20 $\pm$ 0,1) °С. Постоянная ячейки K (в см$^{-1}$) определяется уравнением:

$$K = R \cdot k_{ст,}$$

где R – измеренное сопротивление стандартного раствора, мегаОм (МОм);

$k_{ст}$ – электропроводность используемого стандартного раствора, мкСм · см$^{-1}$.

Если определение постоянной ячейки проводят при температуре, которая отличается от 20 °С, например для области температур от 15 до 25 °С, исправленное значение электропроводности для этой температуры может быть вычислено по уравнению:

$$k_T = k_{20°C} \cdot [1+ 0{,}021(T - 20)] ,$$

где k_T – величина электропроводности при температуре, установленной при калибровке в соответствии с фармакопейной статьей;

$k_{20°C}$ – величина электропроводности стандартного раствора при 20 °С;

T – температура, установленная при калибровке в соответствии с фармакопейной статьей, °С;

0,021 – температурный коэффициент для электропроводности стандартного раствора калия хлорида.

2. Определение электропроводности испытуемого раствора. После калибровки аппаратуры сертифицированным стандартным раствором ячейку электропроводности несколько раз промывают водой, свободной от углекислого газа, и по крайней мере два раза – испытуемым раствором. Проводят последовательные измерения, как указано в фармакопейной статье.

Электрофорез **ОФС.1.2.1.0021.15**

Взамен ст. ГФ XI, вып.1

Электрофорез – метод анализа, основанный на способности заряженных частиц, растворенных или диспергированных в электролите, перемещаться под действием внешнего электрического поля.

Различие физико-химических свойств заряженных частиц (размер, форма, величина заряда), а также влияние факторов электролитической среды (напряженность электрического поля, природа среды, вязкость электролита, pH, температура среды, а также продолжительность электрофореза) обусловливают различие скоростей перемещения частиц и, следовательно, обеспечивают их разделение. При электрофорезе на твердых носителях на подвижность и эффективность разделения дополнительное влияние оказывают: адсорбция, неоднородность вещества носителя и его ионообменные свойства, размер пор, электроосмос и капиллярный эффект.

Электрофоретическая подвижность является величиной, характерной для данного вещества. Различают абсолютную и относительную электрофоретическую подвижность. Абсолютная электрофоретическая подвижность, формирующаяся под влиянием внешнего электрического поля, измеряется в сантиметрах в секунду. Относительная электрофоретическая подвижность представляет собой отношение подвижности исследуемого вещества к подвижности другого вещества, принятого за стандарт.

Все электрофоретические методы могут быть разделены на две основные категории: электрофорез в свободном растворе, называемый также электрофорезом с подвижной границей или фронтальным электрофорезом; и

электрофорез на поддерживающих средах, называемый также зональным электрофорезом.

Фронтальный электрофорез

В данном методе воздействию электрического тока подвергается раствор электролита и анализируемые компоненты, помещенные непосредственно в раствор. Этот метод является способом прямого определения электрофоретической подвижности веществ в отсутствие влияния эффектов носителя (адсорбции, электроосмоса, неоднородности среды), однако метод непригоден для выделения чистых компонентов анализируемой смеси из-за низкого разрешения. Метод может применяться для веществ с относительно высокой молекулярной массой, обладающих низкой диффузионной способностью.

Зональный электрофорез

В этом методе используется неподвижный носитель, по поверхности или через объем которого осуществляется миграция ионов, причем стабилизация электролита на плотной матрице позволяет предотвратить конвекцию и смешивание зон после разделения компонентов.

В зависимости от среды и способа проведения зональный электрофорез имеет несколько вариантов. Природа поддерживающей плотной среды (бумага, силикагель, пленки из ацетата целлюлозы, гели на основе крахмала, агарозы, полиамидов или смешанные гели) вносит множество дополнительных факторов, изменяющих подвижность. Если среда не является электрически нейтральной, то в ней на подвижность анализируемых компонентов дополнительное влияние оказывает электроосмотический поток. Например, в капиллярном электрофорезе электроосмотический поток возникает из-за образования двойного слоя между раствором и внутренней стенкой капилляра. Внутренняя стенка плавленого кварца отрицательно заряжена за счет присутствия диссоциированных силанольных групп. Этот отрицательно заряженный слой притягивает положительные ионы из

раствора, в результате чего образуется положительно заряженное кольцо жидкости, движущееся в направлении отрицательно заряженного катода.

Электроосмотический поток сильно зависит от pH. Он присутствует только при значениях pH более 4. Чем выше значение pH, тем более четко выражен эффект. Электроосмотический поток может быть уменьшен в результате химической модификации или покрытия внутренней стенки капилляра положительно заряженными амфолитами.

Профиль электроосмотического потока очень плоский по сравнению с гидродинамическим потоком, профиль которого параболический. В результате электроосмотический поток не вызывает размывания пиков.

Разогрев среды, вследствие эффекта Джоуля, может вызывать некоторое испарение жидкости из поддерживающей среды, которое, вследствие капиллярных взаимодействий, вызывает перемещение раствора от краев пластинки к центру.

Следовательно, скорость перемещения зависит от 4 главных факторов: подвижности заряженной частицы, электроосмотического потока, скорости испарения и напряженности поля. Для достижения воспроизводимых результатов необходимо установить и контролировать определенные условия электрофореза (напряжение, температура и т. д.) и использовать реактивы установленной квалификации.

Многообразие методов электрофореза связано с большим количеством разных способов стабилизации электрофоретической среды (градиенты плотности с добавлением глицерина, гликолей, сахарозы, полиаминополикарбоновых кислот), носителей различной природы и разнообразия способов их использования (электрофорез в крахмальном блоке, в тонком слое, на колонке, в пленке или в пластине геля, в трубках или на бумаге).

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ФАКТОРОВ НА ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКУЮ ПОДВИЖНОСТЬ

Влияние заряда, размера частицы, вязкости электролита и градиента напряжения. Электрофоретическая подвижность заряженной частицы непосредственно связана с величиной заряда и обратно пропорциональна размеру частицы, непосредственно связанному, в свою очередь, с ее молекулярной массой. Поскольку пептиды и другие биологически активные вещества, которые могут быть проанализированы методом электрофореза, обычно не имеют идеальной сферической формы и не подчиняются закону Стокса, то их электрофоретическая подвижность (u_0) лучше всего описывается уравнением:

$$u_0 = \frac{v}{E} = \frac{Q}{A \cdot 3{,}14 \cdot r^2 \cdot \eta},$$

где v – скорость частицы;

E – градиент напряжения, наложенный на электролит;

A – коэффициент формы, обычно в диапазоне от 4 до 6, который показывает обратную зависимость подвижности от квадрата радиуса. В терминах молекулярной массы это подразумевает обратную зависимость подвижности от 2/3 единицы молекулярной массы;

Q – заряд частицы;

r – радиус частицы;

η – вязкость электролита.

Влияние величины pH. Электрофоретическая подвижность зависит от величины pH раствора, влияющей на степень ионизации вещества. В качестве примера на рисунке приведена зависимость подвижности глицина от величины pH.

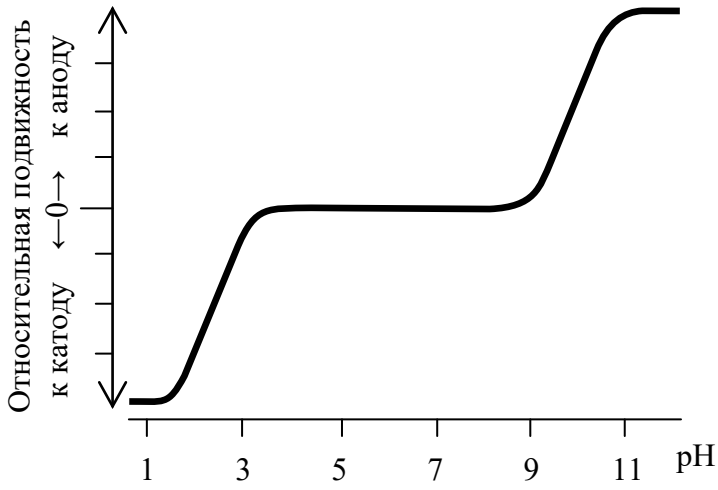


Рисунок – Зависимость подвижности глицина от величины pH

Значения pK_a 2,2 и 9,9 совпадают с точками перегиба графика. Так как соответствующие функциональные группы на 50 % ионизированы при тех значениях, где pH = pK_a, то электрофоретическая подвижность в этих точках составляет половину от величины, наблюдаемой для полностью ионизированного катиона и аниона, существующего при очень низком и очень высоком значении pH, соответственно. Цвиттер-ион, который существует в промежуточном диапазоне значений pH, электрически нейтрален и имеет нулевую подвижность.

Влияние ионной силы и температуры. Электрофоретическая подвижность уменьшается с увеличением ионной силы применяемого электролита. Ионная сила μ определяется как:

$$\mu = 0{,}5 \sum C_i Z_i \,,$$

где C_i – концентрация иона, моль/л;

Z_i – валентность иона.

Для буферных растворов, в которых и анион, и катион являются одновалентными, ионная сила равна молярности.

Ионная сила электролитов, используемых для электрофореза, обычно выбирается в пределах от 0,01 до 0,10, что зависит от состава образца, так как буферная емкость должна быть достаточно большой, чтобы поддерживалось постоянное значение pH по области расположения зон компонентов.

Температура влияет на подвижность косвенно, так как вязкость η применяемого электролита является величиной, зависимой от температуры. Вязкость воды уменьшается приблизительно на 3 % при изменении температуры на 1 °C в диапазоне температур от 0 до 5 °C и, с меньшей скоростью, в диапазоне комнатных температур. Поэтому подвижность увеличивается с увеличением температуры электролита.

Капиллярный электрофорез	**ОФС.1.2.1.0022.15** **Вводится впервые**

Капиллярный электрофорез – это физический метод анализа, основанный на миграции внутри капилляра заряженных частиц в растворе электролита под влиянием приложенного электрического поля.

Скорость миграции частиц определяется их электрофоретической подвижностью и электроосмотической подвижностью буферного раствора.

Электрофоретическая подвижность вещества ($\mu_{эф}$) зависит от его характеристик (электрического заряда, размеров и формы) и от характеристик буферной среды, в которой происходит разделение (типа и ионной силы электролита, pH, вязкости и добавок):

$$\mu_{эф} = \frac{q}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r} \quad , \quad (1)$$

где q – эффективный заряд частицы;

η – вязкость раствора электролита;

r – стоксовский радиус частицы.

Электрофоретическую скорость ($\nu_{эф}$) для вещества сферической формы определяют по формуле:

$$\nu_{эф} = \mu_{эф} \cdot E = \mu_{эф} \cdot \frac{V}{L} \quad , \quad (2)$$

где E – сила электрического поля;

V – приложенное напряжение;

L – общая длина капилляра.

Когда к капилляру, заполненному буферным раствором, приложено электрическое поле, внутри капилляра образуется поток растворителя, называемый электроосмотическим потоком. Скорость и направление электроосмотического потока зависят от электроосмотической подвижности ($\mu_{эо}$), определяемой знаком и плотностью заряда на внутренней стенке капилляра, а также характеристиками буфера:

$$\mu_{эо} = \frac{\varepsilon \cdot \zeta}{\eta} \quad , \quad (3)$$

где ε – диэлектрическая константа буфера;

ζ – дзета-потенциал поверхности капилляра.

Электроосмотическую скорость ($\nu_{эо}$) рассчитывают по формуле:

$$\nu_{эо} = \mu_{эо} \cdot E = \mu_{эо} \cdot \frac{V}{L} \quad , \qquad (4)$$

Электрофоретическая и электроосмотическая подвижность ионов могут быть направлены в одну и ту же или в противоположные стороны в зависимости от заряда частиц; таким образом, скорость движения растворенного вещества будет определяться уравнением:

$$\nu = \nu_{эф} \pm \nu_{эо}, \qquad (5)$$

Если электроосмотическая скорость выше электрофоретической, можно одновременно разделить как положительно, так и отрицательно заряженные ионы. Время, затраченное ионом для миграции от конца, в котором вводится образец, до места детекции (l – эффективная длина капилляра), определяют по формуле:

$$t = \frac{l}{\nu_{эф} \pm \nu_{эо}} = \frac{l \cdot L}{(\mu_{эф} \pm \mu_{эо}) \cdot V} \quad . \qquad (6)$$

Как правило, капилляры из плавленого кварца без покрытия при pH выше 3 несут на внутренней поверхности отрицательный заряд из-за диссоциации силанольных групп. При этом электроосмотический поток направлен от анода к катоду.

В некоторых случаях необходимо уменьшить или изменить направление электроосмотического потока. Для этого различным образом модифицируют внутреннюю стенку капилляра или изменяют pH буферного раствора.

После введения образца в капилляр каждый анализируемый ион движется внутри фонового электролита в виде отдельной зоны в соответствии со своей электрофоретической подвижностью. Степень размывания каждой зоны растворенного соединения определяется совокупностью различных причин. В идеальном случае единственной причиной размывания зон является продольная молекулярная диффузия растворенного вещества вдоль капилляра. В этом, идеальном, случае эффективность разделения полосы, характеризуемая числом теоретических тарелок (N), выражается формулой:

$$N = \frac{(\mu_{эф} + \mu_{эо}) \cdot V \cdot l}{2 \cdot D \cdot L}, \qquad (7)$$

где D – молекулярный коэффициент диффузии растворенного вещества в буферном растворе.

На практике на размывание полос значительное влияние оказывают тепловое рассеяние, адсорбция образца на стенке капилляра, различная проводимость между образцом и буфером, длительность ввода пробы, размеры детектирующей ячейки и различия уровней жидкости в емкостях с буферными растворами.

Разделение между двумя полосами, называемое разрешением (R_s), определяют по формуле (8):

$$R_S = \frac{\sqrt{N} \cdot (\mu_{эфб} - \mu_{эфа})}{4 \cdot (\bar{\mu}_{эф} + \mu_{эо})}, \qquad (8)$$

где $\mu_{эфб}$ и $\mu_{эфа}$ – электрофоретические подвижности каждого из двух разделенных ионов;

$\bar{\mu}_{эф}$ – их средняя электрофоретическая подвижность.

Среднюю электрофоретическую подвижность определяют по формуле:

$$\bar{\mu}_{эф} = 0{,}5 \cdot (\mu_{эфб} + \mu_{эфа}), \quad (9)$$

Оборудование

Система для капиллярного электрофореза состоит из высоковольтного источника напряжения; двух флаконов с буферными растворами и погруженными в них электродами; капилляра, заполненного соответствующим раствором и погруженного обоими концами во флаконы с буферными растворами; системы ввода образца; детектора, способного в режиме реального времени регистрировать вещества, проходящие мимо оптического окна капилляра; системы термостатирования; регистрирующего прибора или подключенного компьютера.

Для введения пробы могут использоваться три способа: гидростатический – за счет разного уровня буферных растворов, гидродинамический – с помощью прилагаемого давления или вакуума и электрокинетический – благодаря прилагаемому напряжению. В последнем случае степень ввода в капилляр каждого компонента пробы зависит от соответствующей электрофоретической подвижности. Электрокинетическая система ввода для многокомпонентной смеси с разной электрофоретической подвижностью ведет к изменению соотношения концентраций ее составляющих и в данном случае может адекватно применяться лишь для качественного анализа. При условии определения в многокомпонентной смеси одного или двух соединений этот метод может использоваться и для количественного анализа. Кроме того, такой способ введения может позволить увеличить чувствительность анализа.

Детектирование осуществляется с помощью абсорбционной спектрофотометрии в ультрафиолетовой и видимой областях, флуориметрии, кондуктометрии, амперометрии или масс-спектрометрии.

Для обнаружения не поглощающих в ультрафиолетовой области и не флуоресцирующих соединений используется непрямое детектирование. В этом случае в ведущий электролит вводится вещество, поглощающее

ультрафиолетовое излучение и образующее выраженное фоновое поглощение. При этом зона определяемого вещества визуализируется в виде обратного пика. С использованием специального программного обеспечения электрофореграмме придают стандартный вид.

Применяемый раствор электролита фильтруют для того, чтобы удалить крупные частицы (размером более 0,45 мкм), и дегазируют для предотвращения образования пузырьков воздуха, которые могут быть помехой для детектирующей системы или могут нарушить электропроводность в капилляре во время проведения анализа. Для хорошей воспроизводимости времени миграции анализируемых компонентов проб для каждого определения должна быть разработана определенная процедура промывки капилляра.

Основными формами проведения капиллярного электрофореза являются: капиллярный зонный электрофорез, мицеллярная электрокинетическая хроматография, капиллярный гель-электрофорез, капиллярное изоэлектрическое фокусирование и капиллярный изотахофорез.

Капиллярный зонный электрофорез

Аналиты разделяются в капилляре, содержащем только буферный раствор. Разделение происходит за счет того, что различные компоненты образца движутся с разными скоростями, образуя так называемые зоны. Скорость движения каждой зоны зависит от электрофоретической подвижности растворенного вещества и от электроосмотического потока в капилляре. Для уменьшения адсорбции веществ на поверхности плавленого кварца могут использоваться капилляры с модифицированной внутренней поверхностью.

Использование капиллярного зонного электрофореза позволяет выполнить разделение как малых (молекулярная масса < 2 кДа), так и больших молекул (2 кДа < молекулярная масса < 100 кДа). При этом может быть обеспечено разделение молекул, имеющих лишь незначительные отличия в соотношениях заряда к массе. Этот способ позволяет также

разделять хиральные соединения, для чего в буферный раствор вводятся хиральные селекторы.

Время разделения обратно пропорционально приложенному напряжению, однако увеличение используемого напряжения может вызвать избыточное выделение тепла, приводящее к возникновению градиентов температуры и, как следствие, вязкости буфера внутри капилляра. Этот эффект вызывает уширение полос и уменьшение разрешения. Температура изменяет вязкость буфера и электропроводность и, следовательно, влияет на скорость миграции. В некоторых случаях возрастание температуры в капилляре может вызвать конформационные изменения белков, изменяя времена их миграции и эффективность разделения.

Длина и внутренний диаметр капилляра влияют на время анализа, эффективность разделения и нагрузочную емкость. Увеличение как эффективной, так и общей длины капилляра может уменьшить электрическое поле, что увеличивает время миграции. При заданном буфере и электрическом поле от внутреннего диаметра капилляра зависят тепловое рассеивание и, следовательно, уширение полос образца.

Для предотвращения адсорбции компонентов анализируемой пробы на стенке капилляра применяются различные подходы: экстремальные значения pH, адсорбция положительно заряженных буферных добавок, покрытие внутренней стенки капилляра различными полимерами (нейтральными, гидрофильными, катионными или анионными).

Ведущий электролит для капиллярного электрофореза должен иметь оптимальное значение ионной силы, увеличение которой приводит к возрастанию силы тока, уменьшению электроосмотического потока и, соответственно, снижению скорости движения пробы.

Буферные системы для капиллярного электрофореза должны иметь оптимальную буферную емкость в выбранном диапазоне pH и низкую электропроводность для уменьшения возникающего тока. Для симметричной формы регистрируемого пика необходимо, чтобы скорость движения ионов

буфера примерно соответствовала скорости движения аналита. Увеличение концентрации буфера (при заданном pH) уменьшает электроосмотический поток и скорость движения пробы.

Значение pH буферного раствора влияет на разделение, изменяя заряд анализируемого соединения и добавок, а также электроосмотический поток. При разделении белков и пептидов изменение pH буфера от более низкого, чем изоэлектрическая точка, к более высокому изменяет суммарный заряд растворенного вещества от отрицательного к положительному. Увеличение pH буфера обычно увеличивает электроосмотический поток.

Среда для растворения пробы важна для достижения концентрирования образца. Органические модификаторы (метанол, ацетонитрил и др.) добавляют к водному буферному раствору для увеличения растворимости пробы, а также для изменения степени ионизации компонентов образца. Добавление этих органических модификаторов обычно вызывает уменьшение электроосмотического потока.

Для разделения оптических изомеров к буферному раствору добавляют хиральные модификаторы: циклодекстрины, краун-эфиры, полисахариды и белки. Другими факторами, контролирующими разрешение в хиральном разделении, являются концентрация хирального модификатора, состав и pH буфера, а также температура. Использование органических компонентов, таких, как метанол или мочевина, может также влиять на достигаемое разрешение.

Мицеллярная электрокинетическая хроматография

В мицеллярной электрокинетической хроматографии разделение осуществляется в растворе электролита, содержащего поверхностно-активное вещество в концентрации выше критической концентрации мицеллообразования. Молекулы растворенного вещества распределяются между буферным раствором и псевдостационарной фазой, состоящей из мицелл. Этот метод может использоваться для разделения как заряженных, так и нейтральных молекул. В качестве анионного поверхностно-активного

вещества наиболее часто используется додецилсульфат натрия, в качестве катионного – соли цетилтриметиламмония.

При нейтральных и щелочных значениях pH возникает сильный электроосмотический поток, который движет ионы разделяющего буфера в сторону катода. При использовании в качестве поверхностно-активного вещества додецилсульфата натрия электрофоретическое движение анионных мицелл направлено в противоположную сторону – к аноду. В результате суммарная скорость движения мицелл снижена по сравнению с основным потоком раствора электролита. В случае нейтральных веществ скорость движения компонента, не имеющего электрофоретической подвижности, зависит только от его коэффициента распределения между мицеллой и водной средой. На электрофореграмме сначала появляется пик маркера электроосмотического потока, затем пики аналитов, и в конце – пик маркера мицелл. Время между первым и последним пиком называется окном разделения. На движение заряженных веществ влияют как их коэффициенты распределения между мицеллой и водным буферным раствором, так и их собственная электрофоретическая подвижность.

Движение аналитов и разрешение может быть описано термином «фактор удерживания (k)», представляющим собой отношение молярных долей аналита в мицелле и в подвижной фазе. Для нейтрального вещества k вычисляют по формуле:

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0\left(1 - \frac{t_R}{t_{mc}}\right)} = K\frac{V_S}{V_M}, \qquad (10)$$

где t_R – время миграции аналита;
t_0 – время миграции неудерживаемого вещества;
t_{mc} – время миграции мицеллы;
K – коэффициент распределения аналита;
V_S – объем мицеллярной фазы;
V_M – объем подвижной фазы.

Разрешение для двух близко движущихся аналитов (R_S) рассчитывают по формуле:

$$R_S = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \frac{(\alpha - 1)}{\alpha} \cdot \frac{k_b}{(k_b + 1)} \cdot \frac{1 - (\frac{t_0}{t_{mc}})}{1 + k_a \cdot (\frac{t_0}{t_{mc}})}, \qquad (11)$$

где N – число теоретических тарелок для одного из аналитов;

α – селективность разделения;

k_a и k_b – коэффициенты удерживания обоих аналитов соответственно ($k_b > k_a$).

Время разделения обратно пропорционально приложенному напряжению, однако следует учитывать, что увеличение напряжения может вызвать избыточное выделение тепла, приводящее к возникновению градиентов температуры и вязкости буферного раствора. Этот эффект вызывает уширение полос и уменьшение разрешения.

Как и в капиллярном зонном электрофорезе, при мицеллярной электрокинетической хроматографии длина и внутренний диаметр капилляра влияют на время анализа и эффективность разделения. Увеличение длины капилляра уменьшает электрическое поле, увеличивает время миграции и повышает эффективность разделения. Уменьшение внутреннего диаметра повышает рассеяние тепла и увеличивает разрешение.

Величина pH среды влияет на электроосмотический поток в немодифицированных капиллярах. Уменьшение pH снижает электроосмотический поток и вследствие этого увеличивает разрешение нейтральных веществ в мицеллярной электрокинетической хроматографии за счет увеличения времени анализа.

Для улучшения разделения гидрофобных веществ в мицеллярной электрокинетической хроматографии используют органические модификаторы (метанол, пропанол, ацетонитрил и др.). При этом необходимо учитывать, что добавление органического модификатора влияет на критическую концентрацию мицеллообразования.

Для разделения с помощью мицеллярной электрокинетической хроматографии энантиомеров в мицеллярную систему включают хиральные

селекторы: ковалентно связанные с поверхностно-активным веществом (соли N-додеканоил-L-аминокислот, соли желчных кислот и др.) или вводимые в состав электролита (циклодекстрины).

Для улучшения селективности разделения в мицеллярной электрокинетической хроматографии применяют также вещества, способные изменить взаимодействие аналита с мицеллой путем адсорбции на последней. Этими добавками могут быть второе поверхностно-активное вещество (ионное или неионное), ведущее к образованию смешанных мицелл, катионы металлов, которые распределяются в мицелле и образуют координационные комплексы с аналитом, а также ион-парные соединения, которые взаимодействуют с заряженными компонентами пробы и задерживают их, например, тетрабутиламмония бромид.

Капиллярный гель-электрофорез

В капиллярном гель-электрофорезе разделение происходит внутри капилляра, заполненного гелем, действующим в качестве молекулярного сита. При равном отношении заряда к массе более мелкие компоненты движутся в капилляре быстрее, чем более крупные. Капиллярный гель-электрофорез может быть использован для разделения биологических макромолекул по их молекулярной массе. Электроосмотический поток при этом полностью устраняется путем модификации внутренней стенки капилляра.

В капиллярном гель-электрофорезе используются два типа гелей: химически модифицированные и динамически модифицированные. Химически модифицированные гели, как, например, поперечно-сшитый полиакриламид, поливинилпирролидон, готовятся внутри капилляра посредством полимеризации мономеров. Они обычно связаны с кварцевой стенкой капилляра и не могут быть удалены без его разрушения. При использовании таких гелей для анализа белков в редуцирующих условиях буферный раствор содержит обычно додецилсульфат натрия и образцы перед вводом денатурируют нагреванием в смеси додецилсульфата натрия с 2-

меркаптоэтанолом или дитиотрейтолом. При анализе в нередуцирующих условиях 2-меркаптоэтанол и дитиотрейтол не используют. Разделение в поперечно сшитых гелях оптимизируют модификацией буферного раствора (как указано в разделе «Капиллярный зонный электрофорез») и контролем пористости геля во время его приготовления. Пористость этих гелей регулируют изменением концентрации акриламида, а также его соотношения со сшивающим реагентом. Уменьшение пористости геля ведет к уменьшению подвижности аналитов. Из-за неподвижности таких гелей допустимо только электрокинетическое введение пробы.

Динамически модифицированные гели являются гидрофильными полимерами, как, например, линейный полиакриламид, производные целлюлозы, декстран и т. п., которые могут быть растворены в водных разделительных буферных растворах с образованием разделяющей среды, действующей как молекулярное сито. После приготовления они могут быть введены в капилляр под давлением. Замена геля перед каждой инжекцией улучшает воспроизводимость разделения. Пористость гелей увеличивается при использовании полимеров с большей молекулярной массой или уменьшении концентрации полимера. Для выбранного буферного раствора уменьшение пористости геля ведет к уменьшению подвижности компонентов раствора. Так как растворение этих полимеров в буферном растворе дает растворы с низкой вязкостью, может быть использован гидродинамический или электрокинетический ввод пробы.

Капиллярное изоэлектрическое фокусирование

В изоэлектрическом фокусировании заряженные молекулы движутся под воздействием электрического поля в pH-градиенте, созданном амфолитами с широким диапазоном значений p*I*, растворенными в буфере разделения.

Тремя основными этапами изоэлектрического фокусирования являются введение пробы, фокусирование и мобилизация.

Этап введения пробы осуществляют в один прием, когда образец смешивается с амфолитами и вводится в капилляр под давлением или под вакуумом, или в несколько приемов, когда в капилляр последовательно вводится ведущий буферный раствор, амфолиты, образец, смешанный с амфолитами, снова амфолиты и, наконец, заключающий буферный раствор. Объем образца должен быть достаточно малым, чтобы не изменять pH-градиент.

На этапе фокусирования амфолиты движутся после приложения напряжения к катоду или аноду согласно их суммарному заряду, создавая, таким образом, pH-градиент от более низкого pH (у анода) к более высокому pH (у катода). Движение каждого аналита продолжается до тех пор, пока он не достигнет pH, соответствующего его изоэлектрической точке (pI).

На этапе мобилизации полосы разделенных компонентов приводятся в движение в сторону детектора благодаря электроосмотическому потоку путем приложения давления после стадии фокусирования или с помощью добавления солей к флакону у катода или анода.

Достигнутое разделение, выражаемое как $\Delta \mathrm{p}I$, зависит от градиента pH $d\mathrm{pH}/dx$, количества амфолитов, имеющих различные значения pI, молекулярного коэффициента диффузии (D), интенсивности электрического поля (E) и вариации электрофоретической подвижности аналита в зависимости от pH $-d\mu/d\mathrm{pH}$:

$$\Delta \mathrm{p}I = 3 \cdot \sqrt{\frac{D\,(d\mathrm{pH}/dx)}{E\,(-d\mu/d\mathrm{pH})}}. \qquad (12)$$

Основными параметрами, которые следует учитывать при разработке разделения, являются:

– *Напряжение*. В капиллярном изоэлектрическом фокусировании используется очень высокое электрическое поле – от 300 до 1000 В/см на этапе фокусирования.

– *Капилляр*. Электроосмотический поток должен быть уменьшен или полностью подавлен. Для уменьшения электроосмотического потока используют капилляры с модифицированной внутренней поверхностью.

– *Растворы*. Анодный флакон заполняется буферным раствором с pH ниже, чем p*I* наиболее кислого амфолита, а катодный флакон заполняется раствором с pH выше, чем p*I* наиболее щелочного амфолита. Обычно для анода используется фосфорная кислота, а для катода – натрия гидроксид.

Добавление в раствор амфолита полимера, такого как метилцеллюлоза, ведет к подавлению конвекции и электроосмотического потока при увеличении вязкости. Широкие диапазоны pH используются для оценки изоэлектрической точки, в то время как более узкие диапазоны применяются для улучшения точности.

Осаждение белков в их изоэлектрической точке во время этапа фокусирования предотвращают в случае необходимости с помощью таких буферных добавок, как глицерин, поверхностно-активные вещества, мочевина или цвиттерионные буферные соли.

Капиллярный изотахофорез

Изотахофорез – это метод разделения, который проводится в режиме поддержания постоянства тока (все разделенные зоны движутся с одной скоростью). При этом должно обеспечиваться постоянное отношение между концентрацией и подвижностью ионов в каждой зоне.

В капиллярном изотахофорезе применяются два буферных раствора, между которыми находятся зоны аналита. Например, для анализа анионов буфер должен быть выбран таким образом, чтобы ведущий электролит содержал анион с фактической подвижностью, превышающей характерную для разделяемых веществ. Аналогично ион завершающего электролита должен иметь меньшую подвижность, чем подвижность разделяемых

веществ. В результате разделения ведущий анион движется первым, за ним движется анион с очередной высокой подвижностью и т. д. В капиллярном изотахофорезе индивидуальные анионы мигрируют в дискретных зонах, но все движутся с той же скоростью, что и ведущий анион. Концентрации анализируемых веществ одинаковы в каждой зоне; таким образом, длина каждой зоны пропорциональна количеству отдельного компонента. Зоны менее сконцентрированные, чем ведущий электролит, сужаются, зоны более сконцентрированные – расширяются. Принцип изотахофореза используется для предварительного концентрирования образца перед разделением его компонентов с помощью других методик капиллярного электрофореза.

Обработка результатов

Качественный анализ. К качественным результатам относится определение идентичности компонента пробы внутреннему или внешнему стандартному веществу по времени появления соответствующего пика.

Полуколичественный анализ. Полуколичественным результатом считается определение концентрации компонента пробы по площади или высоте пика при соотношении сигнал/фон от 2:1 до 3:1.

Отношение сигнал/шум (*S/N*) рассчитывают по формуле:

$$S/N = \frac{2\,H}{h}, \qquad (13)$$

где: H – высота пика целевого компонента на электрофореграмме раствора сравнения, измеренная от максимума пика до базовой линии сигнала;

h – уровень шума на электрофореграмме, полученной после ввода холостой пробы.

Количественный анализ. Количественным результатом является определение концентрации искомого компонента пробы по площади пика при соотношении сигнал/шум больше, чем 3:1.

При количественном анализе образца для компенсации различий во временах миграции от анализа к анализу и для устранения различий в сигналах компонентов образца, обладающих различными временами миграции, площади пиков должны быть нормированы на соответствующие

времена миграции. При использовании внутреннего стандарта необходимо убедиться, что ни один пик исследуемого вещества не маскируется пиком внутреннего стандарта.

Абсолютное содержание компонентов рассчитывают по отношению площадей анализируемого пика и пика стандарта. Процентное содержание одного или более компонентов анализируемого образца рассчитывают путем определения процентной доли скорректированных площадей пиков от общей площади всех пиков, за исключением пиков, вызванных растворителями или другими добавленными реактивами (процедура нормализации).

В качестве параметров пригодности системы используются: кажущееся число теоретических тарелок (N), разрешение (R_s), фактор емкости (k') (только для мицеллярной электрокинетической хроматографии) и фактор симметричности (A_s).

Кажущееся число теоретических тарелок (N) может быть рассчитано эмпирически по формуле:

$$N = 5{,}54\left(\frac{t_r}{w_{0,5}}\right)^2, \qquad (14)$$

где t_r – время миграции или расстояние вдоль базовой линии от точки ввода пробы до перпендикуляра, опущенного из максимума пика соответствующего компонента;

$w_{0,5}$ – ширина пика на половине высоты.

Разрешение (R_s) между пиками схожей величины двух компонентов вычисляют по формуле:

$$R_S = \frac{1{,}18(t_{r,b} - t_{r,a})}{w_{0,5,a} + w_{0,5,b}}, \qquad (15)$$

$$t_{r,b} > t_{r,a},$$

где $t_{r,b}$ и $t_{r,a}$ – времена миграции или расстояния вдоль базовой линии от точки ввода пробы до перпендикуляров, опущенных из максимумов двух соседних пиков;

$w_{0,5,a}$ и $w_{0,5,b}$ – ширина пиков на половине высоты.

Фактор симметричности пика рассчитывают по формуле:

$$A_S = \frac{w_{0,05}}{2d} \ , \qquad (16)$$

где $w_{0,05}$ – ширина пика на 1/20 от его высоты;

d – расстояние между перпендикуляром, опущенным из максимума пика, и передним краем пика на 1/20 от высоты пика.

В качестве параметров пригодности используются также испытания на воспроизводимость площади (стандартное отклонение площади или отношения площади к времени миграции) и воспроизводимость времени миграции (стандартное отклонение времени миграции).

Перечень условий, подлежащих указанию

В фармакопейной статье указывают использование определенного капилляра, буферного раствора, метода предварительной подготовки капилляра, пробоподготовки и условий миграции.

Электрофорез в полиакриламидном геле	**ОФС.1.2.1.0023.15 Вводится впервые**

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на метод молекулярной биологии и биохимии – электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ), используемый для разделения белков и нуклеиновых кислот, который основан на движении заряженных биологических макромолекул в постоянном электрическом поле. Разделение в полиакриламидном геле происходит за счёт различий заряда разделяемых молекул и отличий молекулярных масс, а также в зависимости от конфигурации молекул. Изменяя концентрацию полимера, можно получать гели с широким диапазоном размеров пор, позволяющих проводить разделение белков и пептидов с молекулярными массами от 2 до 300 кДа. Можно также изменять электрический заряд макромолекул (путем вариации pH буферного раствора) и их конформацию за счет введения в буферный раствор денатурирующих агентов или детергентов.

Протекание через жидкость электрического тока неизбежно связано с выделением тепла, поэтому следует обеспечивать теплоотвод и стабильность температурного режима с целью исключения изменений вязкости, проводимости и скорости потока и, следовательно, искажения зон анализируемых компонентов.

Для наблюдения за процессом в исходный препарат добавляют краситель, молекулы которого несут электрический заряд того же знака, что и фракционируемые молекулы, но не взаимодействуют с ними, причем

скорость миграции наиболее подвижных макромолекул пробы должна быть несколько ниже, чем у молекул красителя. Когда фронт красителя достигает противоположной границы геля, электрофорез прекращают.

Разделившиеся зоны биополимеров во избежание их диффузии немедленно фиксируют. Для этого гель извлекают из стеклянной формы и выдерживают в смеси кислоты со спиртом так, что белки или нуклеиновые кислоты фиксируются в том самом месте, где закончилась их миграция. После фиксации или одновременно с ней проводят окрашивание зон путем выдерживания геля в растворе красителя, прочно связывающегося с белком или нуклеиновой кислотой. Излишек красителя удаляют.

Вместо окрашивания или наряду с ним могут использоваться радиоактивные метки и приемы регистрации полос на фотопленке посредством авторадиографии или флюорографии и различные способы счета радиоактивности в геле с помощью жидкостных сцинтилляционных счетчиков.

Характеристики полиакриламидных гелей

Гель полиакриламида имеет ряд преимуществ, определяющих его широкое использование. Он прозрачен, химически стабилен, инертен, устойчив к изменениям pH и температуры, нерастворим в большинстве растворителей, и, наконец, в нем практически отсутствуют адсорбция и электроосмос.

Разделяющие свойства полиакриламидных гелей (ПААГ) определяются трехмерной сетью волокон и пор, которая сформирована за счет бифункциональных бисакриламидных связей между смежными полиакриламидными цепями. Полимеризация катализируется системой, производящей свободные радикалы, составленной из аммония персульфата и тетраметилэтилендиамина.

С увеличением концентрации акриламида в геле эффективный размер пор уменьшается. Эффективный размер пор геля определяет его разделяющие свойства, то есть сопротивление геля к перемещению

макромолекул. Существуют пределы концентраций акриламида, которые могут использоваться. При высоких концентрациях акриламида гели становятся более ломкими и трудны в обращении. С уменьшением размера пор геля уменьшается скорость перемещения белка через гель. Регулируя размер пор геля путем изменения концентрации акриламида, можно оптимизировать разрешающую способность метода для конкретного анализируемого образца. Таким образом, физическое состояние ПААГ характеризуется по составу акриламида и бисакриламида. Обычно используются гели, в которых общая концентрация мономера и сшивающего агента находится в диапазоне от 3 до 30 %, а количество сшивающего агента обычно составляет от одной десятой до одной двадцатой от количества мономера. При этом содержание сшивающего агента тем меньше, чем выше общая концентрация геля.

Электрофорез белков в полиакриламидных гелях с натрия додецилсульфатом

Электрофорез в полиакриламидных гелях с использованием натрия додецилсульфата (SDS) – наиболее распространенный способ электрофореза, используемый для оценки подлинности и чистоты белковых продуктов. Денатурированные под воздействием высокой температуры полипептиды, связываясь с анионным детергентом SDS, становятся отрицательно заряженными и приобретают конформацию, при которой радиус Стокса является функцией молекулярной массы независимо от типа белка. Поскольку количество связанного SDS почти всегда пропорционально молекулярной массе полипептида и не зависит от последовательности аминокислот в полипептиде, SDS-полипептидные комплексы мигрируют через полиакриламидные гели с подвижностью, прямо пропорциональной молекулярной массе полипептида.

Молекулярная масса белка может быть оценена по его относительной подвижности на прокалиброванном геле, и обнаружение отдельной полосы в таком геле является критерием чистоты.

Однако, наличие у полипептида радикалов типа N- или O-связанных гликозидов оказывает существенное влияние на оценку молекулярной массы белка, поскольку SDS не связывается с углеводной частью молекулы так же, как с полипептидной. Таким образом, пропорциональность отношения «заряд к массе» не выдерживается и электрофоретическая подвижность белков, подвергшихся посттрансляционным модификациям, не является истинным отражением молекулярной массы полипептидной цепи.

Восстанавливающие условия

Трехмерная структура белков часто поддерживается за счет дисульфидных связей. Цель анализа SDS-ПААГ в восстанавливающих условиях состоит в том, чтобы разрушить эту структуру путем расщепления дисульфидных связей. Денатурация и дезагрегация белков заключается в обработке их 2-меркаптоэтанолом или дитиотреитолом (DTT), в результате которой происходит разрыв S-S связей, разворачивание полипептидной цепи и последующее связывание с SDS. В этих условиях молекулярная масса полипептидных субъединиц может быть рассчитана методом линейной регрессии при использовании подходящих стандартов молекулярных масс.

Невосстанавливающие условия

Без обработки восстанавливающими агентами типа 2-меркаптоэтанола или DTT дисульфидные ковалентные связи остаются неповрежденными и разделения на полипептидные субъединицы не происходит. Невосстановленные белки не могут полностью насыщаться SDS и, следовательно, не могут связывать детергент в постоянном массовом отношении. Это делает определение молекулярных масс этих молекул методом SDS-ПААГ менее стандартизованным, чем исследование полностью денатурированных полипептидов. Однако, выявление одной полосы в таком геле (т.е. отсутствие любых компонентов, отличных от основного компонента) является показателем чистоты белка.

Электрофорез белков в полиакриламидных гелях с натрия додецилсульфатом (SDS-PAGE), как правило, проводится в неоднородной

буферной системе, которая описывается ниже.

Электрофорез в геле с неоднородной буферной системой (диск-электрофорез)

Метод диск-электрофореза, благодаря своей высокой разрешающей способности, рекомендуется для характеристики смесей белков и для обнаружения примесей, которые могут иметь подвижность, близкую к подвижности главного компонента.

Метод подразумевает использование прерывистой системы, состоящей из двух отличных гелей: разделяющего (нижнего) геля и концентрирующего (верхнего) геля. Эти два геля имеют различную пористость (верхний – крупнопористый, нижний – мелкопористый). Кроме степени пористости, эти два геля резко различаются по pH и молярности буферов, в которых они полимеризуются. Пористость, длина и тип буфера для нижнего геля определяются точно такими же соображениями, что и для простого непрерывного электрофореза.

Отличительной особенностью данного вида электрофореза является обязательное использование в составе электродного буферного раствора подвижных ионов, мигрирующих в том же направлении, что и белки; например, применение иона Cl^- для щелочных буферных растворов или иона K^+ – для кислых. В этом буферном растворе подвижность иона, мигрирующего в том же направлении, что и белок, должна сильно зависеть от pH. Для этого удобно использовать цвиттерионы: например, простые аминокислоты (глицин и р-аланин). Их изоэлектрические точки лежат в нейтральной области pH (для глицина pI=5,97).

Под действием электрического поля ионы глицина, входящие в состав электродного буферного раствора, следуют за белками в концентрирующий гель. Область перемещающихся границ быстро формируется под действием высоко подвижных хлорид-ионов во фронте и относительно медленных замыкающих ионов глицина. Хлорид-ион из-за его небольшого размера мигрирует быстрее, чем любой из белков, присутствующих в образце.

Величина pH образца и концентрирующих слоев выбирается так, чтобы быть приблизительно на 3 единицы ниже, чем верхнее значение pK_a глицина. Поэтому, на пересечении этих слоев только около 0,1% глициновых молекул имеют отрицательный заряд. Таким образом, быстродвижущиеся хлорид-ионы постепенно замещаются ионами глицина, которые при pH 6,8 в концентрирующем геле нейтрализуются и перестают участвовать в проведении тока. Сопротивление верхней части концентрирующего геля резко возрастает, а вместе с ним возрастает и напряженность поля. Локализованные зоны высоковольтового градиента между передним и задним ионными фронтами вызывают относительно высокую скорость миграции белков в концентрирующем геле, которая не ограничивается благодаря крупнопористой структуре этого геля.

На границе концентрирующего и разделяющего гелей белки достигают высокоплотных слоев геля и замедляются из-за уменьшающегося размера пор разделяющего геля. Более высокое значение pH, с которым фронт электродного буферного раствора встречается в разделяющем геле, также заставляет глицинат мигрировать быстрее, и напряженность поля падает, что также снижает скорость движения белков. Таким образом, происходит концентрирование пробы и все компоненты образца, независимо от первоначальной высоты столбика пробы в лунке, входят в нижний гель практически одновременно в виде узкой зоны с высокой концентрацией белка.

В мелкопористом разделяющем геле начинается процесс медленной миграции белков и их фракционирования в зависимости от молекулярных масс, а то обстоятельство, что процесс разделения начинается с узкой исходной зоны, обеспечивает высокую разрешающую способность системы вцелом.

Оборудование

Прибор для электрофореза состоит из:

1) источника постоянного тока с регулируемым напряжением и со

стабилизатором напряжения;

2) камеры для электрофореза, служащей для размещения пластинки или трубки геля и поддержания постоянных условий проведения анализа. Камера обычно имеет прямоугольную форму, изготовлена из стекла или твердой пластмассы с двумя изолированными буферными резервуарами (анодным и катодным), содержащими раствор электролита. В каждый резервуар погружен электрод (например, платиновый), подключенный к соответствующему полюсу источника тока. Должен поддерживаться одинаковый уровень электролитов в резервуарах, чтобы предотвратить поток жидкости и гидростатическое давление на гель. Камера для электрофореза оснащена крышкой, которая предотвращает испарение растворителей и обеспечивает равномерно насыщенную влагой атмосферу во время всего процесса. Предпочтительно использование предохранителя для отключения электропитания, когда крышка камеры снята. Если мощность тока, приложенного к электрофоретической пластинке, превышает 10 Вт, то рекомендуется применять охлаждение камеры.

3) устройства для заливки геля, представляющего собой стеклянную трубку, стеклянную пластину или пару прямоугольных пластин (ячейку), служащих для формирования поддерживающей среды, в которой непосредственно проводится процесс электрофоретического разделения. Пластины могут быть расположены в камере вертикально или горизонтально (вариант горизонтального электрофореза обычно применяется для агарозных гелей) и должны быть погружены или иметь контакт посредством фитилей с катодным и анодным изолированными буферными резервуарами, содержащими раствор электролита. Преимуществом пластин для проведения процесса является возможность сравнения образцов в одной общей ячейке геля, что более информативно по сравнению с набором гелей из ряда трубок. Преимущество горизонтальных пластин по сравнению с вертикальными заключается в отсутствии проблемы герметизации швов, а недостаток – в большой поверхности контакта с воздухом и, соответственно, риске

испарения жидкости.

Сборку прибора и его очистку после использования проводят в соответствии с инструкцией производителя.

Перед заливкой геля основание и боковые стороны ячейки закрывают подходящими прокладками, толщина которых определяет толщину рабочего геля (при этом после полимеризации геля прокладку в основании убирают). Ячейку заполняют раствором мономера с поперечно-сшивающим агентом и катализатором. Растворы должны быть дегазированы перед полимеризацией и гели должны использоваться свежеприготовленными. Заливку растворов проводят таким образом, чтобы исключить попадание внутрь ячейки пузырьков воздуха.

Гребенку, имеющую зубцы соответствующего размера (в зависимости от объемов наносимого образца), устанавливают в верхнюю часть ячейки на разделяющий гель и оставляют там до окончания полимеризации геля. Формирование геля обычно занимает не менее 30 мин и может считаться законченным, когда между гелем и водным слоем появляется четкая граница. После удаления гребенки из геля, прошедшего полимеризацию, остается ряд лунок.

Заполняют нижний и верхний резервуары камеры предписанным электродным буферным раствором. Готовят испытуемый и стандартный растворы, содержащие краситель и сахарозу или другой плотный и вязкий растворитель. Наносят образцы шприцем или микропипеткой в основания лунок, сразу включают электрический ток и начинают электрофорез, соблюдая предписанные условия (температуру и величину напряжения).

После окончания процесса (когда краситель достигает нижней границы пластины) ток выключают, пластину удаляют из камеры, зоны фиксируют, окрашивают и при необходимости пластину высушивают.

Подготовка полиакриламидного геля для вертикального электрофореза с SDS в неоднородной буферной системе

Сначала готовят и заливают в подготовленную ячейку нижний

разделяющий гель, а затем сверху наслаивают концентрирующий гель.

Приготовление разделяющего геля

В конической колбе готовят рассчитанное в зависимости от объема ячейки количество раствора для разделяющего геля, содержащего требуемую концентрацию акриламида, используя значения, приведенные в Таблице 1. Смешивают компоненты в указанном порядке. В тех случаях, где требуется, перед добавлением раствора аммония персульфата и тетраметилэтилендиамина (TEMED) раствор фильтруют, и, если необходимо, дегазируют раствор через мембрану из ацетата целлюлозы (с диаметром пор 0,45 мкм) под вакуумом при перемешивании. Добавляют соответствующие количества раствора аммония персульфата и TEMED как указано в табл. 1, перемешивают и немедленно заливают в промежуток между двумя стеклянными пластинами ячейки. Оставляют достаточное место для концентрирующего геля (длина зубцов гребенки плюс 1 см). Используя суженную стеклянную пипетку, тщательно наслаивают на гель сверху воду или изобутанол. Оставляют гель в вертикальном положении при комнатной температуре до завершения полимеризации.

Приготовление концентрирующего геля

После окончания полимеризации воду или изобутанол сливают и промывают верхнюю часть геля несколько раз водой, чтобы удалить остатки неполимеризованного акриламида и изобутанола, если он использовался. Сливают с верхней части геля так много жидкости, как только возможно и затем удаляют любую оставшуюся влагу фильтровальной бумагой.

В конической колбе готовят соответствующее количество раствора, содержащего требуемую концентрацию акриламида, используя значения, приведенные в табл. 2. Смешивают компоненты в том же порядке и с использованием тех же приемов фильтрации и дегазирования, что и для разделяющего геля. После добавления соответствующих количеств раствора аммония персульфата и TEMED, как указано в табл.2, перемешивают и немедленно заливают в промежуток между двумя стеклянными пластинами

ячейки непосредственно на поверхность полимеризованного разделяющего геля. Немедленно, но с осторожностью, вставляют чистую тетрафторполиэтиленовую гребенку в раствор концентрирующего геля так, чтобы избежать попадания в гель воздушных пузырей. Добавляют избыточное количество раствора концентрирующего геля так, чтобы полностью заполнить пространство между зубцами гребенки.

Таблица 1 – Приготовление разделяющего геля

Компоненты раствора	**Объем компонента (мл) на ячейку заданного объема**							
	5 мл	**10 мл**	**15 мл**	**20 мл**	**25 мл**	**30 мл**	**40 мл**	**50 мл**
1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**
4% акриламида								
Вода очищенная	2,6	5,3	7,9	10,6	13,2	15,9	21,2	26,6
Раствор акриламида[1)]	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	8,0	10,0
1,5М Трис (pH 8,8)[2)]	1,3	2,5	3,8	5,0	6,3	7,5	10,0	12,5
100 г/л SDS[3)]	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
100 г/л APS[4)]	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
TEMED[5)]	0,004	0,008	0,012	0,016	0,02	0,024	0,032	0,04
8% акриламида								
Вода очищенная	2,3	4,6	6,9	9,3	11,5	13,9	18,5	23,2
Раствор акриламида[1)]	1,3	2,7	4,0	5,3	6,7	8,0	10,7	13,3
1,5М Трис (pH 8,8)[2)]	1,3	2,5	3,8	5,0	6,3	7,5	10,0	12,5
100 г/л SDS[3)]	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
100 г/л APS[4)]	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
TEMED[5)]	0,003	0,006	0,009	0,012	0,015	0,018	0,024	0,03
10% акриламида								
Вода очищенная	1,9	4,0	5,9	7,9	9,9	11,9	15,9	19,8
Раствор акриламида[1)]	1,7	3,3	5,0	6,7	8,3	10,0	13,3	16,7
1,5М Трис (pH 8,8)[2)]	1,3	2,5	3,8	5,0	6,3	7,5	10,0	12,5
100 г/л SDS[3)]	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
100 г/л APS[4)]	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
TEMED[5]	0,002	0,004	0,006	0,008	0,01	0,012	0,016	0,02
12% акриламида								
Вода очищенная	1,6	3,3	4,9	6,6	8,2	9,9	13,2	16,5
Раствор акриламида[1)]	2,0	4,0	6,0	8,0	10,0	12,0	16,0	20,0
1,5М Трис (pH 8,8)[2)]	1,3	2,5	3,8	5,0	6,3	7,5	10,0	12,5
100 г/л SDS[3)]	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
100 г/л APS[4)]	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
TEMED[5)]	0,002	0,004	0,006	0,008	0,01	0,012	0,016	0,02

Компоненты раствора	**Объем компонента (мл) на ячейку заданного объема**							
	5 мл	**10 мл**	**15 мл**	**20 мл**	**25 мл**	**30 мл**	**40 мл**	**50 мл**
1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**
14% акриламида								
Вода очищенная	1,4	2,7	3,9	5,3	6,6	8,0	10,6	13,8
Раствор акриламида[1)]	2,3	4,6	7,0	9,3	11,6	13,9	18,6	23,2
1,5 М Трис (pH 8,8)[2)]	1,3	2,5	3,8	5,0	6,3	7,5	10,0	12,5
100 г/л SDS[3)]	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
100 г/л APS[4)]	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
TEMED[5)]	0,002	0,004	0,006	0,008	0,01	0,012	0,016	0,02
15% акриламида								
Вода очищенная	1,1	2,3	3,4	4,6	5,7	6,9	9,2	11,5
Раствор акриламида[1)]	2,5	5,0	7,5	10,0	12,5	15,0	20,0	25,0
1,5М Трис (pH 8,8)[2)]	1,3	2,5	3,8	5,0	6,3	7,5	10,0	12,5
100 г/л SDS[3)]	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
100 г/л APS[4)]	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
TEMED[5)]	0,002	0,004	0,006	0,008	0,01	0,012	0,016	0,02

Таблица 2 – Приготовление концентрирующего геля

Компоненты раствора	Объем компонента (мл) на ячейку заданного объема							
	1 мл	2 мл	3 мл	4 мл	5 мл	6 мл	8 мл	10 мл
Вода очищенная	0,68	1,4	2,1	2,7	3,4	4,1	5,5	6,8
Раствор акриламида[1)]	0,17	0,33	0,5	0,67	0,83	1,0	1,3	1,7
1,0М Трис (pH 6,8)[6)]	0,13	0,25	0,38	0,5	0,63	0,75	1,0	1,25
100 г/л SDS[3)]	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,08	0,1
100 г/л APS[4)]	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,08	0,1
TEMED[5)]	0,001	0,002	0,003	0,004	0,005	0,006	0,008	0,01

[1)] Раствор акриламида: 30% раствор акриламида/бисакриламида (29:1)
[2)] 1,5М Трис (pH 8,8): 1,5 М буферный раствор трис-гидрохлорида, pH 8,8
[3)] 100 г/л SDS: раствор натрия додецилсульфата 100 г/л
[4)] 100 г/л APS: раствор аммония персульфата 100 г/л. Аммония персульфат является источником свободных радикалов, которые управляют полимеризацией акриламида и бисакриламида. Таким образом, раствор аммония персульфата должен добавляться медленно.
[5)] TEMED: тетраметилэтилендиамин.
[6)] 1,0М Трис (pH 6,8): 1 М буферный раствор трис-гидрохлорида, pH 6,8

Гель со вставленной гребенкой оставляют в вертикальном положении при комнатной температуре до окончания полимеризации.

Если в фармакопейной статье нет других указаний, то определение молекулярных масс проводят при нагрузке на лунку 10 мкг общего белка, а

определение чистоты – при нагрузке 40 мкг при окрашивании Кумасси бриллиантовым R250, а при окрашивании нитратом серебра достаточно 2–5 мкг белка на лунку.

Толщина гребенки выбирается точно в соответствии с толщиной используемых прокладок, а размер зубцов – в соответствии с предполагаемым объемом образцов. Необходимый и достаточный объем формируемой лунки определяется как произведение длины, ширины и высоты (в микрометрах) одного зубца гребенки: $V = L \cdot D \cdot H$.

Объем наносимого образца вычисляют следующим образом:

$$V_x = k \cdot X/C,$$

где: k – коэффициент разбавления пробы буферным раствором для образца;

X – требуемое для нанесения на гель количество белка в зависимости от целей анализа, в мкг;

C – концентрация общего белка, определяемая по методу Лоури, в мкг/мл.

Установка геля в прибор для электрофореза и процесс разделения

После окончания полимеризации аккуратно удаляют гребенку, немедленно ополаскивают лунку водой, чтобы удалить любые остатки неполимеризованного акриламида. Если необходимо, выправляют зубцы концентрирующего геля при помощи тупой подкожной иглы, насаженной на шприц.

Устанавливают гель в прибор для электрофореза согласно инструкциям изготовителя оборудования. Добавляют электродный буферный раствор в верхнюю и нижнюю буферные емкости. Обычно, если нет других указаний в фармакопейной статье, в качестве электродного буферного раствора используется трис-глициновый буферный раствор с pH 8,3-8,4.

Удаляют любые пузыри, которые могут появиться у основания геля между стеклянными пластинами. Не следует включать электрический ток до внесения образцов, так как это уничтожит неоднородность буферных систем.

Готовят испытуемый раствор и раствор сравнения в рекомендованном

буферном растворе для образцов в соотношении, указанном в фармакопейной статье или нормативной документации.

Обычно для обеспечения полной денатурации образец в смеси с буферным раствором подвергают дополнительно температурной обработке, режим которой должен быть указан в фармакопейной статье или нормативной документации.

Наносят соответствующие объемы каждого из растворов в лунки концентрирующего геля. Начинают электрофорез, используя условия, рекомендуемые изготовителем оборудования.

Изготовители оборудования для SDS-ПААГ могут обеспечивать применение гелей различной площади и толщины. Соответственно продолжительность электрофореза и сила тока (или напряжение) могут быть изменены, как описано изготовителем прибора, чтобы достичь оптимального разделения, что проверяют по скорости перемещения фронта индикатора в разделяющем геле.

Когда индикатор достигает основания геля, электрофорез останавливают. Удаляют ячейку с гелем из прибора и отделяют стеклянные пластины. Удаляют прокладки, отрезают и удаляют концентрирующий гель и немедленно проводят процедуру окрашивания. Для того, чтобы можно было выявить присутствие в исследуемом образце агрегатов и других компонентов, не входящих в гель, концентрирующий гель рекомендуется обрезать не полностью, оставляя 2–3 мм.

Так называемые, «готовые к использованию» коммерческие гели и наборы реактивов к ним могут быть применены при условии, что они дают результаты, отвечающие валидационным критериям, приведенным ниже в разделе «Оценка пригодности системы».

Обнаружение белков в гелях

Окрашивание Кумасси бриллиантовым R250 – наиболее распространенный метод окрашивания белков с пределом обнаружения порядка от 1 до 10 мкг белка в полосе. Окрашивание нитратом серебра –

более чувствительный метод окрашивания белков в гелях, позволяющий выявлять до 1 нг белка.

Для селективного окрашивания гликозилированных белков или липопротеидов иногда применяют другие красители или их смеси, о чем должно быть сделано дополнительное указание в фармакопейной статье или нормативной документации.

Все процедуры окрашивания геля проводят, как правило, при комнатной температуре и при слабом перемешивании в любом удобном контейнере. При окрашивании геля следует использовать одноразовые перчатки, иначе на геле могут быть прокрашены отпечатки пальцев.

Окраска раствором Кумасси

Погружают гель в большой избыток красящего раствора Кумасси раствора и выдерживают, по крайней мере, 1 ч. Поскольку кислотно-спиртовой состав окрашивающего раствора не позволяет полностью фиксировать белки на геле, это может приводить к потерям некоторых низкомолекулярных белков во время окрашивания и обесцвечивания тонких гелей. Полная фиксация возможна при выдерживании геля в 10 % растворе трихлоруксусной кислоты в течение 1 ч перед погружением в окрашивающий Кумасси раствор.

Для ускорения процедуры окрашивания допускается подогрев геля в окрашивающем растворе в микроволновой печи. Режим подогрева должен быть описан в фармакопейной статье или нормативной документации. Затем окрашивающий раствор удаляют и гель промывают водой.

Обесцвечивают гель избытком обесцвечивающего раствора. Заменяют порции обесцвечивающего раствора несколько раз до тех пор, пока окрашенные полосы белка не станут ясно различимы на прозрачном фоне. Чем более полно обесцвечен гель, тем меньшие количества белка могут быть обнаружены этим методом. Обесцвечивание может быть ускорено при добавлении в обесцвечивающий раствор нескольких граммов анионобменной смолы или маленького кусочка пористого материала.

После обесцвечивания гель промывают водой и либо высушивают, либо оставляют в воде для хранения при температуре от 2 до 8 °С.

Окраска раствором нитрата серебра

Погружают гель в большой избыток фиксирующего раствора и выдерживают в течение 1 ч. Фиксирующий раствор сливают, добавляют новую порцию того же раствора и инкубируют, по крайней мере 1 ч или оставляют на ночь. Сливают фиксирующий раствор и промывают гель в большом избытке воды в течение 1 ч. После этого пропитывают гель в течение 15 мин в 1 % растворе глутарового альдегида. Промывают гель дважды по 15 мин большим количеством воды. Выдерживают гель в темноте в свежеприготовленном 2 % растворе серебра нитрата в течение 15 мин. Промывают гель три раза по 5 мин в большом количестве воды. Погружают гель приблизительно на 1 мин в проявляющий раствор, пока не будет достигнуто удовлетворительное окрашивание. Окрашивание прекращают в момент проявления полосы в треке с минимальным количеством препарата (например, 0,001 мкг). Останавливают развитие окраски погружением в стоп-раствор на 15 мин. Ополаскивают гель водой.

Целесообразно использовать готовые наборы реактивов для окрашивания гелей серебра нитратом.

Высушивание проявленных SDS-полиакриламидных гелей

В зависимости от используемого метода окрашивания подготовку геля к высушиванию проводят различными способами:

– при окраске Кумасси после процедуры обесцвечивания гель выдерживают в смеси 10,0 г глицерина и 92 мл воды очищенной не менее 2 ч (возможна инкубация «на ночь»);

– при окраске нитратом серебра гель после заключительной процедуры ополаскивания выдерживают в течение 5 мин в смеси 2,0 г глицерина и 98 мл воды очищенной.

Погружают два листа пористой целлюлозной пленки в воду и выдерживают в течение 5–10 мин. Растягивают один из листов на рамке для

высушивания. Аккуратно помещают пропитанный в глицериновом растворе гель на натянутую целлюлозную пленку. Удаляют все случайно попавшие воздушные пузыри, и заливают вокруг граней геля несколько миллилитров воды. Помещают второй лист пленки сверху и снова удаляют все воздушные пузыри. Заканчивают сборку рамки для сушки геля и помещают ее в сушильный шкаф или оставляют при комнатной температуре до полного высыхания.

Определение молекулярных масс белков

Молекулярные массы белков определяют по сравнению их подвижностей с подвижностью нескольких белков-маркеров известной молекулярной массы. Готовые смеси белков с точно известными молекулярными массами (маркеры) для калибрования гелей предлагаются производителями материалов и оборудования для электрофореза в различных диапазонах молекулярных масс. Концентрированные исходные растворы полипептидов известной молекулярной массы готовят в соответствующем буферном растворе для образцов и наносят на гель одновременно с образцом испытуемого белка.

Сразу после того, как электрофорез завершен, следует отметить положение полосы красителя бромфенолового синего, которая соответствует электрофоретическому ионному фронту. Это может быть сделано при помощи меток-надрезов в геле или путем прокола геля в зоне окрашенного фронта иглой, предварительно обмакнутой в черную тушь или другой подходящий контрастный краситель.

После окрашивания геля измеряют расстояния пробега для каждой полосы белка (маркеров и испытуемого образца) от вершины разделяющего геля. Вычисляют отношение расстояния пробега каждого белка к расстоянию пробега фронта красителя. Нормализованные расстояния пробега, вычисленные таким образом, называются относительными подвижностями белков (относительно фронта красителя) и обозначаются как R_f.

$$R_f = \frac{R}{R_S},$$

где: R – расстояние пробега белка;

R_S – расстояние пробега красителя

Строят график зависимости логарифма относительных молекулярных масс стандартов белка (M_r) от значения R_f. Неизвестные молекулярные массы могут быть оценены методом линейной регрессии или интерполяцией кривых зависимости $\log M_r$ от R_f в том случае, если значения, полученные для испытуемых образцов, находятся в линейной части графика.

Количественное определение примесей

В тех случаях, когда в фармакопейной статье указан предел примесей, то перед анализом должен быть приготовлен раствор сравнения, соответствующий этому уровню примеси, путем разбавления испытуемого раствора. Например, в случае 5 % предела, раствор сравнения должен быть приготовлен разведением испытуемого раствора в соотношении 1:20. При этом примесь (полоса, отличная от главной полосы) на электрофореграмме с испытуемым препаратом не должны быть интенсивнее, чем полоса, полученная с раствором сравнения. При наличии нескольких полос примесей должно быть предусмотрено требованию к содержанию каждой из них и к содержанию суммы примесей.

Приемлемым условием определения примесей может считаться метод количественной нормализации с использованием денситометрического интегрирования. В этом случае предварительно должна быть показана линейность отклика прибора.

ОЦЕНКА ПРИГОДНОСТИ СИСТЕМЫ

Результаты анализа считаются достоверными только в том случае, если:

– белки маркера молекулярных масс распределены приблизительно на 80 % длины геля и охватывают весь требуемый диапазон разделения (например, диапазон молекулярных масс продукта и его димера или продукта и родственных примесей);

– зависимость логарифма молекулярной массы белков-маркеров и

R_f – линейна в необходимом диапазоне.

Дополнительные требования приемлемости результатов анализа должны быть описаны в фармакопейной статье или нормативной документации.

Примечания.

1) Приготовление 30% раствора акриламида/бисакриламида. В мерный стакан вместимостью 250 мл помещают 29,2 г акриламида и 0,8 г N,N'-метиленбисакриламида, растворяют в воде очищенной при перемешивании, доводят объем раствора водой до 100 мл и вновь перемешивают (при необходимости раствор фильтруют, как указано в фармакопейной статье или нормативной документации). Раствор хранят во флаконе из темного стекла при температуре 4–6 °С не более 1 мес.

2) Приготовление раствора натрия додецилсульфата. В мерный стакан вместимостью 250 мл помещают 10,0 г натрия додецилсульфата, растворяют в воде очищенной при аккуратном перемешивании, избегая вспенивания, доводят объем раствора до 100 мл и вновь перемешивают. Раствор хранят при комнатной температуре.

3) Приготовление раствора аммония персульфата. Растворяют 100,0 мг аммония персульфата в 1,0 мл воды очищенной. Раствор используют свежеприготовленным.

4) Приготовление 1,5М буферного раствора трис-гидрохлорида (pH 8,8). В мерный стакан вместимостью 500 мл помещают 90,8 г трис(гидроксиметил)аминометана и растворяют в 400 мл воды. Доводят pH раствора до 8,8 с помощью 1 М раствора хлористоводородной кислоты, затем доводят объем раствора тем же растворителем до 500 мл и перемешивают. Раствор хранят при температуре 4–6 °С не более 1 мес.

5) Приготовление 1,0 М буферного раствора трис-гидрохлорида (pH 6,8). В мерный стакан вместимостью 500 мл помещают 60,6 г трис(гидроксиметил)аминометана и растворяют в 400 мл воды. Доводят pH раствора до 6,8 с помощью 1 М раствора хлористоводородной кислоты, затем доводят объем раствора тем же растворителем до 500 мл и перемешивают. Раствор хранят при температуре 4–6 °С не более 1 мес.

6) Приготовление электродного буферного раствора (10×) (pH 8,3). В мерный стакан, вместимостью 1000 мл помещают 30,0 г трис(гидроксиметил)аминометана, 144,0 г глицина и 10,0 г натрия додецилсульфата, растворяют в воде и доводят объем раствора тем же растворителем до метки. Фильтруют и измеряют pH раствора, который должен быть 8,3 - 8,4. Доводить pH раствора кислотой или щелочью до необходимого значения не допускается.

Раствор хранят при комнатной температуре не более 3 мес.

Непосредственно перед анализом 1 часть приготовленного раствора

смешивают с 9 частями воды очищенной.

7) Приготовление буферного раствора для образцов (4×) для электрофореза в восстанавливающих условиях с 2-меркаптоэтанолом. В химическом стакане смешивают 4,7 мл воды очищенной, 0,5 мл 1М буферного раствора трис-гидрохлорида (pH 6,8), 0,8 мл глицерина, 1,6 мл 10% раствора натрия додецилсульфата, 0,4 мл 2-меркаптоэтанола и 2 мг бромфенолового синего. Раствор хранят при температуре 4–6 °С не более 1 мес.

8) Приготовление буферного раствора для образцов (4×) для электрофореза в восстанвливающих условиях с дитиотреитолом. В химическом стакане тщательно перемешивают 5,0 мл воды очищенной, 0,5 мл 1М буферного раствора трис-гидрохлорида (pH 6,8), 0,8 мл глицерина, 1,6 мл 10% раствора натрия додецилсульфата, 0,06 г 1,4-дитиотреитола и 2 мг бромфенолового синего. Раствор используют свежеприготовленным.

9) Приготовление буферного раствора для образцов (4×) для электрофореза в невосстанвливающих условиях. В химическом стакане тщательно смешивают 5,1 мл воды очищенной, 0,5 мл 1М буферного раствора трис-гидрохлорида (pH 6,8), 0,8 мл глицерина, 1,6 мл 10% раствора натрия додецилсульфата и 2 мг бромфенолового синего. Раствор хранят при температуре 4–6 °С не более 3 мес.

10) Приготовление красящего раствора Кумасси. Раствор готовят по одному из способов приготовления (№ 1 или № 2):

Раствор № 1. Растворяют 0,3 г Кумасси бриллиантового R250 в смеси 100 мл спирта метилового или этилового и 100 мл воды очищенной. Перемешивают до полного растворения (в течение 1 ч). Добавляют 25 мл ледяной уксусной кислоты, доводят объем раствора водой очищенной до 250 мл и перемешивают. Хранят окрашивающий раствор в темной бутыли при комнатной температуре. Раствор хранят при температуре 18-25 ^{0}С в течение 2 мес.

Раствор № 2. 1,0 г Кумасси ярко-голубого R-250 помещают в химический стакан, доводят до объема 250,0 мл этиловым спиртом, перемешивают не менее 3,5 часов до полного растворения красителя, добавляют 100,0 мл кислоты ледяной уксусной и доводят объем деионизованной водой до 1000,0 мл. Раствор хранят при температуре 18-25 ^{0}С в течение 2 мес.

11) Приготовление обесцвечивающего раствора. К 400 мл спирта метилового или этилового добавляют 100 мл ледяной уксусной кислоты, доводят объем раствора до 1000 мл и перемешивают.

12) Приготовление фиксирующего раствора. К 250 мл спирта метилового или этилового добавляют 0,27 мл 37 % раствора формальдегида, доводят объем раствора водой очищенной до 500 мл и перемешивают.

13) Приготовление 1 % раствора глутарового альдегида. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 4 мл 25 % глутарового альдегида или 2 мл 50 % глутарового альдегида, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают.

14) Приготовление раствора серебра нитрата. Смешивают 2,75 мл 25 %

раствора аммиака и 40 мл 1 М раствора натрия гидроксида, прибавляют по каплям при постоянном перемешивании 8 мл 20 % раствора серебра нитрата, доводят объем раствора водой очищенной до 200 мл и перемешивают.

15) Приготовление 20 % раствора серебра нитрата. Растворяют в воде очищенной 2,0 г (точная навеска) серебра нитрата, доводят объем раствора водой до 10 мл и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

16) Приготовление проявляющего раствора. Смешивают 2,5 мл 2,0 % раствора лимонной кислоты и 0,27 мл 37 % раствора формальдегида, доводят объем раствора водой очищенной до 500 мл и перемешивают.

17) Приготовление стоп-раствора. К 50 мл воды прибавляют 10 мл ледяной уксусной кислоты, доводят объем раствора водой очищенной до 100 мл и перемешивают.

В случае использования других реактивов и растворов они должны быть описаны в фармакопейной статье или нормативной документации.

Автоматический элементный анализ	**ОФС.1.2.1.0024.15** **Вводится впервые**

Метод автоматического элементного анализа основан на высокотемпературном (от 1100 до 1800 ºС) окислительном разложении исследуемых веществ с последующим хроматографическим определением компонентов образовавшейся газовой смеси.

Метод автоматического элементного анализа может быть использован для определения содержания активного вещества в фармацевтических субстанциях, в состав молекул которых входят углерод (C), водород (H), азот (N) или сера (S), на основании данных элементного анализа на любой из этих элементов. Применение метода элементного анализа для определения других элементов должно быть описано в фармакопейной статье. Метод может быть использован и для целей идентификации действующего вещества на основе установления его брутто-формулы.

Для определения содержания элементов C, H, N и S в субстанциях проводят высокотемпературное окислительное разложение в потоке гелия, либо его смеси с кислородом в присутствии катализатора окисления. Последующее восстановление оксидов азота до молекулярного азота в присутствии катализатора восстановления и определение образующихся продуктов (CO_2, H_2O, N_2, SO_2), соответствующих определяемым элементам, проводят методом газовой хроматографии.

Метод элементного анализа может быть применен и для определения содержания активного вещества в лекарственных препаратах, но только на основании определения азота, входящего в состав молекулы фармацевтической субстанции, при условии отсутствия азота в молекулах вспомогательных веществ. Вследствие присутствия наполнителей при окислительном разложении лекарственных препаратов образуется большое количество углерода диоксида (CO_2), мешающего определению азота. В связи с этим газохроматографическое определение азота проводится после предварительного поглощения углерода диоксида (вместе с серы диоксидом) и воды.

В качестве катализатора окисления обычно используют меди(II) оксид (CuO) с добавкой ванадия(V) оксида (V_2O_5) или посеребренного кобальта (II,III) оксида (Co_3O_4). В качестве катализатора восстановления используют электролитическую медь. Применение других катализаторов должно быть указано в фармакопейной статье.

Для поглощения диоксидов углерода и серы (CO_2 и SO_2) используют ловушки с натронной известью, воды – с ангидроном или освобождаются от воды в соединительных трубках, стенки которых селективно проницаемы для воды.

Метод применим для анализа как твердых, так и жидких лекарственных средств.

Оборудование

Определение проводят на приборе «автоматический элементный анализатор», основными составными частями которого являются: ультрамикровесы, узел ввода пробы – автодозатор капсулированных (запечатанных в контейнеры из оловянной фольги) проб анализируемых образцов, окислительный и восстановительный реакторы, помещенные в электропечь, ловушки (поглотители), хроматографическая колонка, детектор по теплопроводности и система для обработки данных и управления прибором.

Методика

При анализе твердых лекарственных средств их предварительно тщательно растирают в агатовой ступке.

В качестве стандартных образцов используют ацетанилид, цистеин, метионин с установленным содержанием элементов – стандартные образцы для микроанализа.

Точные навески (от 0,5 до 1,5 мг стандартного образца или субстанции или от 1,0 до 5,0 мг препарата), взятые на ультрамикровесах с точностью до 0,001 мг, помещают в предварительно взвешенные пустые оловянные контейнеры. Запечатывают контейнеры с помощью специального устройства, взвешивают капсулированные образцы и помещают в кассету автодозатора. При увеличении объемов катализаторов окисления и восстановления навеска может быть увеличена в 5 – 10 раз, при этом точность взвешивания может составлять 0,01 мг.

Проводят контрольный опыт, для чего с помощью автодозатора в реактор вбрасывают пустые оловянные контейнеры (количество проб не больше трех); при этом регистрируется содержание определяемого элемента для каждой из них. Затем последовательно сжигают по 3 – 4 навески капсулированных образцов (стандартного и испытуемого).

По полученным значениям площадей пиков стандартных образцов с учетом значения контрольного опыта автоматически строится градуировочный график и рассчитывается поправочный коэффициент K к площади пика определяемого элемента по формуле:

$$K = \frac{y \cdot a_{\text{о}}}{(S_{\text{о}} - S_{\text{к}}) \cdot \frac{}{100}},$$

где y – содержание определяемого элемента в стандартном образце, %;

$S_{\text{о}}$ – площадь пика на хроматограмме стандартного образца;

$S_{\text{к}}$ – площадь пика на хроматограмме контрольного опыта;

$a_{\text{о}}$ – навеска стандартного образца, мг.

Содержание определяемого элемента в испытуемом образце лекарственного средства (субстанции, препарате) в процентах ($X_э$) автоматически рассчитывается по формуле:

$$X_э = \frac{(S - S_к) \cdot K \cdot 100}{a},$$

где S – площадь пика на хроматограмме испытуемого образца;

a – навеска порошка лекарственного средства (для субстанции в пересчете на сухое или безводное вещество), мг.

Содержание лекарственного вещества в субстанции в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{X_э \cdot \text{М.м.}}{\text{А.м.} \cdot n},$$

где М.м. – молекулярная масса лекарственного вещества;

А.м. – атомная масса определяемого элемента;

n – число атомов определяемого элемента в молекуле лекарственного вещества.

Содержание лекарственного вещества в одной дозе препарата в миллиграммах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{X_э \cdot \text{М.м.} \cdot G}{100 \cdot \text{А.м.} \cdot n},$$

где G – средняя масса одной дозы препарата, мг.

Примечания.

1. Навеску анализируемого лекарственного средства выбирают такой, чтобы количество определяемого элемента, образовавшееся в результате сжигания навески испытуемого образца, было близко к количеству, образующемуся при сжигании навески стандартного образца.

2. Используемые реактивы

Ацетанилид, цистеин, метионин – стандартные образцы для элементного анализа.

Меди(II) оксид (CuO). (М.м. 79,545). Кусочки проволоки длиной 1 – 3 мм, толщиной около 1 мм, серого цвета. Поставляется фирмой-производителем элементного анализатора.

Кобальта(II,III) оксид (Co_3O_4) посеребрянный. Гранулы черного цвета диаметром около 1 мм. Поставляется фирмой-производителем элементного анализатора.

Ангидрон. $Mg(ClO_4)_2$. (М.м. 223,20). Магния перхлорат.

Белая пористая масса, очень энергично поглощающая влагу (до 60 % от своей массы) с образованием кристаллогидрата $Mg(ClO_4)_2 \cdot 6H_2O$; растворяется в воде с выделением теплоты, при поглощении воды не расплывается. Применяется для глубокой осушки газов от воды. Может быть обезвожен нагреванием в вакууме до 200 – 250 °С и повторно использован.

Натронная известь. Смесь натрия гидроксида NaOH и гашеной извести $Ca(OH)_2$. Натровая известь. Натристая известь.

Белая пористая масса. Поглощает воду (влагу) и углерода диоксид из воздуха, переходя в смесь карбонатов натрия и кальция.

Аминокислотный анализ **ОФС.1.2.1.0025.18**

Вводится впервые

Введение

Аминокислотный анализ используется для определения качественного и количественного состава аминокислот в белковых, пептидных и других фармацевтических препаратах. Белки и пептиды представляют собой макромолекулы, состоящие из ковалентно связанных аминокислотных остатков, организованных в виде линейного полимера. Последовательность аминокислот в белке или пептиде определяет их свойства. Крупные молекулы белков обычно существуют в виде конденсированных структур с определенной конформацией, тогда как молекулы пептидов меньше и могут состоять всего из нескольких аминокислот.

Аминокислотный анализ может быть использован для количественного определения белков и пептидов, установления их подлинности на основе аминокислотного состава, в качестве дополнительного инструмента при анализе структуры белка и пептида, а также для оценки стратегий фрагментации в пептидном картировании, и для обнаружения атипичных аминокислот, которые могут присутствовать в белке или пептиде. Перед аминокислотным анализом необходимо гидролизовать белок / пептид до

отдельных аминокислот. После гидролиза процедура анализа аминокислот может быть такой же, как и для свободных аминокислот в других фармацевтических препаратах. Аминокислоты, входящие в состав исследуемого образца, обычно подвергаются дериватизации и определяются в виде соответствующих производных, однако существуют методики, основанные на определении нативных аминокислот.

Оборудование

Методы, используемые для аминокислотного анализа, обычно основаны на хроматографическом разделении аминокислот, присутствующих в исследуемом образце. Современные методики используют автоматизированное хроматографическое оборудование, разработанное специально для этих целей. Прибор для анализа аминокислот обычно представляет собой жидкостный хроматограф высокого или сверхвысокого давления, обеспечивающий разделение определяемых аминокислот на хроматографической колонке в режиме градиентного элюирования. Прибор должен иметь возможность проведения пост-колоночной дериватизации, за исключением тех случаев, когда анализ образца выполняется с использованием предколоночной дериватизации.

В качестве детектора обычно используется спектрофотометрический детектор ультрафиолетового / видимого диапазона или флуориметрический детектор (и их сочетания), в зависимости от используемой методики дериватизации. Более сложной и дорогой, но в то же время более информативной и чувствительной альтернативой оптическим детекторам при определении производных аминокислот может быть использование масс-спектрометрического детектирования. Для определения нативных аминокислот возможно использование спектрофотометрического детектора ($\lambda \approx 210$ нм), испарительного детектора светорассеяния, детектора заряженного аэрозоля и электрохимического (амперометрического) детектора, в зависимости от решаемой аналитической задачи, сложность

которой обусловлена числом единовременно определяемых аминокислот, диапазоном определяемых концентраций и мешающим влиянием. Предпочтительно, чтобы используемая аппаратура была специально предназначена для аминокислотного анализа (аминокислотный анализатор).

Для управления прибором, сбора и обработки хроматографических данных обычно используется персональный компьютер со специализированным программным обеспечением.

Общие меры предосторожности

Фоновое загрязнение всегда является проблемой для аналитика при проведении аминокислотного анализа. Необходимо использование реагентов высокой чистоты (например, хлористоводородная кислота с низкой степенью чистоты может способствовать загрязнению глицином). Аналитические реагенты должны обновляться регулярно каждые несколько недель при использовании только растворителей класса чистоты «для высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ)». Для устранения потенциального микробиологического загрязнения и инородных частиц, которые могут присутствовать в растворителях, растворители необходимо фильтровать перед использованием, емкости с растворителями следует хранить закрытыми, а оборудование для анализа аминокислот следует размещать вдали от прямых солнечных лучей и в зонах лаборатории, находящихся вдали от мест постоянного присутствия персонала. Необходимо свести к минимуму все потенциальные источники аминокислотного загрязнения и содержать лабораторию в чистоте, поскольку пыль может способствовать повышению содержания глицина, серина и аланина при попадании в испытуемый образец.

Стабильная работа аминокислотного анализатора – один из критериев получения приемлемых результатов аминокислотного анализа. Если прибор используется для рутинной работы, ежедневно должна проверяться стабильность работы детектора и используемой калибровки, а также

стабильность и приемлемость характеристик хроматографического разделения (времен удерживания и факторов асимметрии пиков аминокислот, разрешения для близкоэлюирующихся пар пиков и эффективности хроматографической колонки).

Стандартные образцы

Универсальные стандартные образцы аминокислот для аминокислотного анализа коммерчески доступны и обычно представляют собой аттестованные по содержанию растворы смесей аминокислот (различного состава) в 0,1 М водном растворе хлористоводородной кислоты или водном буферном растворе, подходящем для выбранной методики анализа. Концентрация всех аминокислот в составе таких стандартных растворов обычно одинакова. Для приготовления стандартных растворов, содержащих строго определенный набор аминокислот с требуемой концентрацией для каждой конкретной аминокислоты (под конкретную задачу), используют охарактеризованные надлежащим образом стандартные образцы отдельных аминокислот (или их солей).

При определении аминокислотного состава стандартные образцы белков или пептидов анализируют в качестве контрольных образцов наряду с испытуемым образцом, чтобы продемонстрировать достоверность всей процедуры. Для этой цели в качестве стандарта белка может быть использован высокоочищенный бычий сывороточный альбумин или другой белок известного состава.

Калибровка прибора

Калибровка прибора для анализа аминокислот обычно включает в себя анализ серии из нескольких разведений исходного стандартного раствора смеси аминокислот для определения факторов отклика и линейных диапазонов определяемых концентраций аминокислот. Для этого анализируют 4-6 разведений исходного стандартного раствора аминокислот,

соответствующих 4-6 уровням концентрации, и строят экспериментальные зависимости площадей пиков аминокислот от их концентраций в соответствующих стандартных растворах. Полученные калибровочные зависимости аппроксимируют линейной функцией (исключение составляют зависимости, полученные с использованием испарительного детектора светорассеяния или детектора заряженного аэрозоля) и используют для расчета концентраций аминокислот, присутствующих в исследуемом образце. Калибровочные зависимости, должны часто обновляться и проверяться путем анализа контрольных образцов для обеспечения достоверности получаемых результатов.

Для получения точных и повторяемых результатов важно, чтобы аналитик готовил образцы для аминокислотного анализа таким образом, чтобы они соответствовали области применимости методики (например, ожидаемые концентрации аминокислот в испытуемом образце находились бы в рамках линейных рабочих диапазонов методики для каждой аминокислоты). При проведении рутинного анализа может использоваться одноточечная калибровка, когда концентрация аминокислот в используемом стандартном растворе соответствует типичным ожидаемым концентрациям аминокислот в испытуемом растворе.

Пробоподготовка

Получение точных результатов аминокислотного анализа требует дополнительной очистки испытуемых образцов белков и пептидов. Буферные компоненты (например, соли, мочевина, детергенты) могут оказывать мешающее влияние и удаляются из образца перед анализом. В методиках, использующих пост-колоночную дериватизацию аминокислот, мешающее влияние буферных компонентов обычно проявляется менее выражено, чем в методиках, основанных на предколоночной дериватизации. В ходе пробоподготовки желательно ограничить количество манипуляций с образцами, чтобы уменьшить потенциальное фоновое загрязнение, улучшить

значение открываемости, рассчитанное для определяемых аналитов, и сократить трудозатраты. Общие методы, используемые для удаления буферных компонентов из испытуемых образцов, включают следующие: (1) полупрепаративное ОФ-ВЭЖХ разделение белка и компонентов пробы, элюирование белка с колонки легкоиспаряющимся элюентом, содержащим достаточную долю органического растворителя, и сушку полученного образца элюата вакуумным центрифугированием; (2) диализ с использованием буферного раствора на основе легколетучих компонентов, или воды; (3) центробежная ультрафильтрация для замены буфера легколетучим буферным раствором или водой; (4) осаждение белка из буфера с использованием органического растворителя (например, ацетона); (5) полупрепаративная гель-фильтрация.

Внутренний стандарт

Для контроля возможных физических и химических потерь, а также возможных отклонений во время аминокислотного анализа, рекомендуется использовать внутренний стандарт. Точно известное количество внутреннего стандарта может быть добавлено к раствору белка до гидролиза. Значение открываемости рассчитанное для внутреннего стандарта теоретически соответствует общему значению открываемости для аминокислот в гидролизате испытуемого образца белка. Свободные аминокислоты, однако, во время гидролиза ведут себя несколько иначе, по сравнению с аминокислотами в составе белка, скорости высвобождения или разрушения которых в ходе гидролиза непостоянны. По этой причине использование внутреннего стандарта для учета потерь при гидролизе может дать ненадежные результаты, что необходимо учитывать. Внутренний стандарт также может быть добавлен к смеси аминокислот после гидролиза для учета возможной нестабильности реагентов (протекания реакции дериватизации), производных аминокислот, а также нестабильности работы прибора в целом.

В идеале внутренний стандарт представляет собой первичную аминокислоту небелкового происхождения, которая является коммерчески доступной и недорогой. Внутренний стандарт должен быть стабильным во время гидролиза, его фактор отклика должен быть постоянным в диапазоне определяемых концентраций целевых аминокислот, кроме того пик внутреннего стандарта на хроматограмме должен обладать уникальным временем удерживания и разрешаться с пиками других аминокислот. На практике в качестве внутреннего стандарта обычно используют норлейцин, нитротирозин и α-аминомасляную кислоту.

Гидролиз белка

Во избежание ошибочных результатов, стеклянная посуда, используемая для гидролиза белков и пептидов, должна быть очень чистой. Пудра с перчаток и отпечатки пальцев на флаконах для гидролиза могут вызвать загрязнение пробы. Для очистки стеклянных флаконов для гидролиза необходимо прокипятить их в течение 1 ч в 1 М хлористоводородной кислоте или замочить в концентрированной азотной кислоте или в смеси равных объемов концентрированных хлористоводородной и азотной кислот. Очищенные вышеописанным способом флаконы для гидролиза промывают высокочистой водой, затем споласкивают метанолом класса чистоты «для ВЭЖХ», сушат в течение ночи в сушильном шкафу и хранят закрытыми вплоть до использования. Альтернативно для устранения загрязнений может быть использован пиролиз чистой стеклянной посуды при температуре 500 °С в течение 4 ч. Также возможно использование адекватной одноразовый лабораторный посуды.

Кислотный гидролиз является наиболее распространенным способом гидролиза образца белка перед аминокислотным анализом. Метод кислотного гидролиза может способствовать ухудшению воспроизводимости результатов анализа из-за полного или частичного разрушения некоторых аминокислот: триптофан разрушается; серин и треонин частично

разрушаются; метионин может подвергаться окислению; цистеин обычно выделяется в виде цистина (однако значение открываемости, рассчитанное для цистина, обычно неудовлетворительное из-за частичного разрушения или восстановления обратно до цистеина). Применение достаточного вакуума (менее 0,2 мм рт. ст. или 26,7 Па) или введение инертного газа (аргона) в свободное пространство реакционного сосуда позволяет снизить уровень окислительной деструкции. Среди пептидных связей, образуемых изолейцином (Иле) и валином (Вал), связи в парах Иле-Иле, Вал-Вал, Иле-Вал и Вал-Иле гидролизуются частично. Аспарагин и глутамин в ходе гидролиза дезамидируются, в результате чего получаются аспарагиновая и глутаминовая кислоты. Потеря триптофана, аспарагина и глутамина во время кислотного гидролиза делает возможным количественное определение только 17 аминокислот. Некоторые из описанных ниже вариантов проведения гидролиза были разработаны для решения этих проблем. Некоторые из этих вариантов (например, методики 4-11) сами могут приводить к модификации других аминокислот. Таким образом, прежде чем использовать способ гидролиза, отличный от обычного кислотного гидролиза, необходимо тщательно проанализировать преимущества и недостатки использования конкретной методики и надлежащим образом апробировать ее.

Для получения информации об исходной концентрации аминокислот, которые подверглись частичному разрушению, или, аминокислот высвобождение которых протекает медленно, часто проводится кинетическое исследование (то есть, аминокислотный анализ после кислотного гидролиза в течение различных по продолжительности временных интервалов, например, в течение 24 ч, 48 ч и 72 ч). По графикам зависимостей концентраций лабильных аминокислот (например, серина и треонина) от времени гидролиза, путем экстраполяции полученных кривых в момент времени t = 0 ч, можно определить теоретические максимальные концентрации этих аминокислот в растворе без учета разрушения. Кинетические исследования

гидролиза также используются в случае аминокислот, которые медленно высвобождаются (например, изолейцин и валин). При проведении продолжительного гидролиза, аналитик будет наблюдать на кинетических кривых появление плато, соответствующего максимально возможному высвобождению данных аминокислот. Если время гидролиза слишком велико, максимальная достигнутая концентрация аминокислот в растворе начнет уменьшаться, указывая на их разрушение в условиях гидролиза.

Приемлемой альтернативой проведению кинетических исследований является проведение гидролиза стандарта аминокислот с известными концентрациями в тех же условиях, что и для испытуемого образца. Скорость разрушения аминокислот в свободной форме может не полностью соответствовать скорости разрушения лабильных аминокислот в составе пептида или белка во время гидролиза. Это особенно справедливо для пептидных связей, которые медленно гидролизуются (например, связи Иле-Вал). Тем не менее, этот метод позволяет аналитику учесть часть потерь аминокислот в процессе гидролиза.

Кислотный гидролиз под воздействием микроволнового излучения также используется и характеризуется быстротой, однако требует специального оборудования, а также специальных мер предосторожности. Оптимальные условия для микроволнового кислотного гидролиза должны подбираться для каждого отдельного образца белковой / пептидной природы. Продолжительность микроволнового гидролиза обычно составляет лишь несколько минут, однако даже небольшие отклонения во времени гидролиза могут привести к неудовлетворительным результатам (например, неполному гидролизу или разрушению лабильных аминокислот). Полный протеолиз с применением смеси протеаз также может использоваться для аминокислотного анализа, однако является слишком сложным, требует надлежащего контроля и обычно больше подходит для пептидов, чем для белков.

Для выбора оптимальных условий гидролиза в ходе первоначального анализа белка неизвестного состава, варьируют продолжительность гидролиза и температуру его проведения.

МЕТОД 1

Кислотный гидролиз с использованием хлористоводородной кислоты, содержащей фенол, является наиболее общей процедурой, используемой для гидролиза белка/пептида при аминокислотном анализе. Добавление фенола предотвращает реакцию галогенирования тирозина.

Гидролизующий раствор. 6 М кислота хлороводородная, содержащая от 0,1 % до 1,0 % фенола.

Выполнение гидролиза

Гидролиз в жидкой фазе. Образец белка или пептида помещают в ампулу для гидролиза и высушивают (образец сушат для того, чтобы вода, содержащаяся в образце, не разбавляла гидролизующий раствор). Прибавляют гидролизующий раствор из расчета 200 мкл на 500 мкг лиофилизированного белка. Образец в ампуле замораживают в бане с сухим льдом и ацетоном (-78 °С) и запаивают ампулу под вакуумом при помощи пламени. Образцы обычно гидролизуют при температуре 110 °С в течение 24 ч в вакууме или в атмосфере инертного газа для предотвращения окисления. Если есть подозрение, что испытуемый белок полностью не гидролизуется, рассматривают возможность проведения гидролиза в течение более продолжительного времени (например, 48 ч и 72 ч).

Парофазный гидролиз. Является одним из наиболее общих методов кислотного гидролиза. Предпочтителен для микроанализа, когда доступны лишь небольшие количества образца. При использовании парофазного гидролиза загрязнение образца кислотными реактивами минимизировано. Флаконы с высушенными образцами помещают в сосуд, содержащий подходящее количество гидролизующего раствора так, чтобы гидролизующий раствор не контактировал с испытуемым образцом. В

свободном пространстве сосуда создают инертную атмосферу или вакуум (менее 0,2 мм рт. ст., или 26,7 Па), гидролиз проводят в течение 24 ч при температуре около 110 °С. Пары кислоты гидролизуют сухой образец. Возможность конденсации кислоты во флаконе с образцом должна быть сведена к минимуму. После гидролиза испытуемый образец сушат в вакууме для удаления остатков кислоты.

МЕТОД 2

Использование меркаптоэтансульфоновой кислоты в качестве восстанавливающей кислоты уменьшает окисление триптофана в процессе гидролиза.

Гидролизующий раствор. 2,5 М раствор меркаптоэтансульфоновой кислоты.

Парофазный гидролиз. От 1 мкг до 100 мкг испытуемого белка / пептида сушат в ампуле для гидролиза. Ампулу помещают в ампулу большего размера, содержащую около 200 мкл гидролизующего раствора. Вакуумированную (около 0,05 мм рт. ст. или 6,7 Па) ампулу большего размера запаивают. Гидролиз проводят при температуре от 170 °С до 185 °С в течение 12,5 мин. После гидролиза ампулу с образцом сушат в вакууме в течение 15 мин для удаления остатков кислоты.

МЕТОД 3

Использование тиогликолевой кислоты в качестве восстанавливающей кислоты предотвращает окисление триптофана при гидролизе.

Гидролизующий раствор. 7 М хлороводородная кислота, содержащая 1 % фенола, 10 % трифторуксусной кислоты и 20 % тиогликолевой кислоты.

Парофазный гидролиз. От 10 мкг до 50 мкг испытуемого белка / пептида высушивают в ампуле для гидролиза. Ампулу для гидролиза

помещают в ампулу большего размера, содержащую около 200 мкл гидролизующего раствора. Ампулу большего размера герметично запаивают в вакууме (около 0,05 мм рт. ст. или 6,7 Па). Гидролиз проводят при температуре 166 °С в течение 15 – 30 мин. После гидролиза для удаления остатков кислоты ампулу с образцом сушат в вакууме в течение 5 мин. Значение открываемости, рассчитанное для триптофана после количественного определения, может зависеть от количества испытуемого образца взятого для гидролиза.

МЕТОД 4

Перед гидролизом белка выполняют окисление цистеина/цистина и метионина при помощи надмуравьиной кислоты.

Окисляющий раствор. Используют свежеприготовленный раствор надмуравьиной кислоты, полученный в результате смешения 1 объема 30 % раствора водорода пероксида и 9 объемов муравьиной кислоты безводной и выдерживания при комнатной температуре в течение 1 ч.

Методика. Образец белка/пептида растворяют в 20 мкл муравьиной кислоты безводной, нагревают при температуре 50 °С в течение 5 мин и прибавляют 100 мкл окисляющего раствора. Процесс окисления проводят в течение 10 – 30 мин. В данной реакции цистеин превращается в цистеиновую кислоту, а метионин – в метионинсульфон. Избыток реактива удаляют из образца при помощи вакуумного центрифугирования. Окисленный белок может быть затем гидролизован по Методу 1 или Методу 2. При наличии галогенидов эта методика может приводить к модификации тирозина.

МЕТОД 5

Окисление цистеина/цистина происходит во время жидкофазного гидролиза в присутствии азида натрия.

Гидролизующий раствор. К 6 М хлороводородной кислоте, содержащей 0,2 % фенола, прибавляют натрия азид до получения конечной концентрации 2 г/л. Прибавление фенола предотвращает галогенирование тирозина.

Жидкофазный гидролиз. Гидролиз белка/пептида проводят при температуре около 110 °С в течение 24 ч. Во время гидролиза присутствующий в образце цистеин/цистин превращается в цистеиновую кислоту под воздействием натрия азида, содержащегося в гидролизном растворе. Эта методика приводит к получению лучших значений открываемости, рассчитанных для тирозина, чем Метод 4, но не подходит для количественного определения метионина. Метионин превращается в смесь из исходного метионина и двух продуктов его окисления – метионинсульфоксида и метионинсульфона.

МЕТОД 6

Окисление цистеина/цистина происходит под воздействием диметилсульфоксида.

Гидролизующий раствор. К 6 М хлористоводородной кислоте, содержащей от 0,1 % до 1,0 % фенола, прибавляют диметилсульфоксид до получения раствора с конечной концентрацией 2 % (об/об).

Парофазный гидролиз. Гидролиз белка/пептида проводят при температуре около 110 °С в течение 24 ч. Во время гидролиза присутствующий в образце цистеин/цистин превращается в цистеиновую кислоту под воздействием диметилсульфоксида, содержащегося в гидролизном растворе. С целью ограничения разброса получаемых результатов и учета частичного разрушения рекомендуется оценивать значение открываемости, рассчитанное для цистеиновой кислоты после окислительного гидролиза стандартного образца белка, содержащего 1–8 остатков цистеина. Фактор отклика для цистеиновой кислоты в гидролизате белка/пептида обычно на 30 % ниже, чем для негидролизованного стандартного образца цистеиновой кислоты. Так как гистидин, метионин,

тирозин и триптофан также модифицируются в ходе пробоподготовки, полный анализ состава белка при использовании этой методики невозможен.

МЕТОД 7

Восстановление и алкилирование цистеина/цистина происходит при пиридилэтилировании в паровой фазе.

Восстанавливающий раствор. 83,3 мкл пиридина, 16,7 мкл 4-винилпиридина, 16,7 мкл трибутилфосфина и 83,3 мкл воды помещают в подходящий сосуд и перемешивают.

Методика. Ампулу для гидролиза с образцом белка/пептида (от 1 мкг до 100 мкг) помещают в ампулу большего размера. Переносят весь восстанавливающий раствор в ампулу большего размера, которую затем вакуумируют и герметично запаивают (около 0,05 мм рт. ст. или 6,7 Па). Реакцию проводят при температуре около 100 °С в течение 5 мин. Затем внутреннюю ампулу помещают в вакуумный эксикатор и сушат в течение 15 мин для удаления остатков реактивов. Пиридилэтилированный образец затем гидролизуют согласно описанным выше методикам. Для оценки значения открываемости, рассчитанного для пиридилэтилцистеина, параллельно проводят реакцию пиридилэтилирования стандартного образца белка, содержащего 1–8 остатков цистеина. Длительное время инкубации при реакции пиридилэтилирования может привести к модификации концевых α- и ε-аминогрупп лизина в белке.

МЕТОД 8

Восстановление и алкилирование цистеина/цистина происходит при пиридилэтилировании в жидкой фазе.

Исходные растворы. Готовят и фильтруют 3 раствора: 1 М раствор ТРИС-гидрохлорида с pH 8,5, содержащий 4 мМ динатрия эдетата (исходный раствор А); 8 М раствор гуанидина гидрохлорида (исходный раствор В); 10 % раствор 2-меркаптоэтанола (исходный раствор С).

Восстанавливающий раствор. Готовят смесь, состоящую из 1 объема исходного раствора А и 3 объемов исходного раствора В (буферный раствор, содержащий 6 М гуанидина гидрохлорида и 0,25 М ТРИС-гидрохлорида).

Методика. Около 10 мкг испытуемого образца растворяют в 50 мкл восстанавливающего раствора и прибавляют около 2,5 мкл исходного раствора С. Выдерживают в течение 2 ч при комнатной температуре в защищенном от света месте в атмосфере азота или аргона. Для проведения реакции пиридинэтилирования к раствору белка прибавляют около 2 мкл 4-винилпиридина и выдерживают дополнительно 2 ч при комнатной температуре в защищенном от света месте. Обессоливают белок/пептид методом ОФ-ВЭЖХ, собирая белковую/пептидную фракцию. Перед кислотным гидролизом собранный образец может быть высушен при помощи вакуумного центрифугирования.

МЕТОД 9

Восстановление и алкилирование цистеина/цистина происходит при карбоксиметилировании в жидкой фазе.

Исходные растворы. Готовят, как указано в Методе 8.

Раствор для карбоксиметилирования. Готовят 100 г/л раствор йодацетамида в 96 % спирте.

Буферный раствор. Используют восстанавливающий раствор, приготовленный, как указано в Методе 8.

Методика. Испытуемый образец растворяют в 50 мкл буферного раствора и прибавляют около 2,5 мкл исходного раствора С. Выдерживают в течение 2 ч при комнатной температуре в защищенном от света месте в атмосфере азота или аргона. Прибавляют раствор для карбоксиметилирования в 1,5-кратном избытке по отношению к теоретическому общему содержанию тиолов, и выдерживают дополнительно в течение 30 мин при комнатной температуре в защищенном от света месте. Если содержание тиолов в белке неизвестно, прибавляют 5 мкл 0,1 М раствора йодацетамида из расчета на каждые

20 нмоль испытуемого образца белка. Для прекращения реакции прибавляют избыток 2-меркаптоэтанола. Обессоливают белок/пептид методом обращенно-фазовой ВЭЖХ, собирая белковую/пептидную фракцию. Перед кислотным гидролизом собранный образец может быть высушен при помощи вакуумного центрифугирования. В процессе кислотного гидролиза полученный S-карбоксиамидометилцистеин будет превращаться в S-карбоксиметилцистеин.

МЕТОД 10

Цистеин/цистин, прореагировавший с дитиогликолевой кислотой или дитиодипропионовой кислотой, образует смешанный дисульфид. Выбор дитиогликолевой кислоты или дитиодипропионовой кислоты зависит от требуемого разрешения пиков в хроматографической методике аминокислотного анализа.

Восстанавливающий раствор. Раствор 10 г/л дитиогликолевой кислоты (или дитиодипропионовой кислоты) в 0,2 М растворе натрия гидроксида.

Методика. Около 20 мкг испытуемого образца помещают в ампулу для гидролиза и прибавляют 5 мкл восстанавливающего раствора. Прибавляют 10 мкл изопропилового спирта и удаляют всю жидкость из образца при помощи вакуумного центрифугирования. Образец гидролизуют, используя Метод 1. Преимущество данного метода заключается в том, что остатки других аминокислот не участвуют в побочных реакциях, а образец не нуждается в обессоливании перед гидролизом.

МЕТОД 11

Аспарагин и глутамин в процессе кислотного гидролиза превращаются в аспарагиновую кислоту и глутаминовую кислоту, соответственно. Аспарагин и глутамин в составе белков/пептидов могут взаимодействовать с бис-(1,1-трифторацетокси)-йодбензолом, что при последующем кислотном гидролизе

приводит к получению диаминопропионовой кислоты и диаминомасляной кислоты, соответственно. Эти превращения позволяют определять в белке/пептиде содержание аспарагина и глутамина в присутствии остатков аспарагиновой кислоты и глутаминовой кислоты.

Восстанавливающие растворы. Готовят и фильтруют 3 раствора: 10 мМ раствор трифторуксусной кислоты (раствор А); 5 М раствор гуанидина гидрохлорида, содержащий 10 мМ трифторуксусной кислоты (раствор В); свежеприготовленный раствор 36 мг/мл бис-(1,1-трифторацетокси)-йодбензола в диметилформамиде (раствор С).

Методика. Около 200 мкг испытуемого образца помещают в чистую ампулу для гидролиза и прибавляют 2 мл раствора А или раствора В и 2 мл раствора С. Ампулу для гидролиза герметично запаивают в вакууме. Полученный образец выдкрживают в течение 4 ч при температуре 60 °С в защищенном от света месте. Затем образец подвергают диализу водой для удаления избытка реактивов. Диализированный образец трижды экстрагируют равными объемами бутилацетата и лиофилизируют. Белок затем может быть гидролизован согласно описанным ранее методикам. Пики α,β-диаминопропионовой и α,γ-диаминомасляной кислот обычно не отделяются от пика лизина при ионохроматографическом разделении. Таким образом, при использовании ионообменной хроматографии для разделения аминокислот содержание аспарагина и глутамина представляет собой разницу между содержаниями аспарагиновой и глутаминовой кислот, полученными в кислотных гидролизатах образцов белка/пептида без предварительной дериватизации бис-(1,1-трифторацетокси)-йодбензолом и с дериватизацией бис-(1,1-трифторацетокси)-йодбензолом. Определяемое содержание треонина, метионина, цистеина, тирозина и гистидина может изменяться при проведении дериватизации бис-(1,1-трифторацетокси)-йодбензолом; при необходимости определения этих аминокислотных остатков следует проводить гидролиз белка/пептида без предварительной дериватизации бис-(1,1-трифторацетокси)-йодбензолом.

Методология аминокислотного анализа: общие принципы

Существует множество методик аминокислотного анализа. Выбор конкретной методики зачастую определяется требуемой чувствительностью количественного определения. В целом, около половины применяемых методик аминокислотного анализа основаны ионохроматографическом разделении свободных аминокислот с последующей пост-колоночной дериватизацией (например, нингидрином или о-фталевым альдегидом).

Методики, основанные на пост-колоночной дериватизации, могут быть использованы для образцов, содержащих небольшое количество буферных компонентов (таких как соли и мочевина) и обычно требуют от 5 до 10 мкг испытуемого образца белка для проведения одного анализа. Остальные методики аминокислотного анализа обычно используют предколоночную дериватизацию свободных аминокислот (например, фенилизотиоцианатом (PITC, ФИТЦ); 6-аминохинолил-N-гидроксисукцинимидилкарбаматом (AQC, АХК) или о-фталевым альдегидом (OPA, ОФА); 4-(диметиламино)азобензол-4’-сульфонилхлоридом (DABS-Cl, дабсилхлорид); 9-фторенилметилхлорформиатом (FMOC-Cl, ФМОК-Cl); 7-фтор-4-нитробензо-2-окса-1,3-диазолом (7-фтор-4-нитробензофуразан, НБФ)) с последующим определением полученных производных аминокислот методом обращенно-фазовой ВЭЖХ. Метод предколоночной дериватизации отличается высокой чувствительностью (обычно требуется от 0,5 до 1,0 мкг испытуемого образца белка для проведения одного анализа), однако его использование может быть ограничено за счет мешающего влияния компонентов солевого буфера, содержащихся в испытуемом образце. Предколоночная дериватизация в некоторых случаях приводит к образованию нескольких производных для одной аминокислоты, что может усложнить интерпретацию результатов. Методики, основанные на пост-колоночной дериватизации, показывают, как

правило, меньшую вариабельность результатов анализа, чем методики, основанные на предколоночной дериватизации.

Для количественного аминокислотного анализа могут быть использованы приведенные ниже методы. Приборы и реактивы, используемые для проведения этих испытаний, коммерчески доступны, как правило, представлены на рынке в виде готовых решений (аминокислотные анализаторы, работа которых основана на методиках с пост-колоночной дериватизацией, и специализированные наборы для ОФ-ВЭЖХ методик, основанных на предколоночной дериватизации). Кроме того, существует множество модификаций этих методов, отличающихся приготовлением реактивов, процедурой дериватизации, условиями хроматографического разделения и так далее. Некоторые параметры могут варьироваться в зависимости от конкретного оборудования и методики выполнения анализа. Многие лаборатории используют несколько методик аминокислотного анализа, так как каждая из них имеет свои преимущества.

МЕТОД 1. Пост-колоночная дериватизация с нингидрином

Ионообменная хроматография с пост-колоночной дериватизацией нингидрином является одним из наиболее распространенных методов, предназначенных для количественного аминокислотного анализа. Как правило, для анализа большинства сложных физиологических образцов используются хроматографические колонки на основе катионообменников в литиевой форме, а экспрессное разделение на катионообменниках в натриевой форме используется для более простых смесей аминокислот, полученных при гидролизе белков (содержащих обычно 17 аминокислот). Разделение аминокислот на ионообменной колонке достигается подбором pH и ионной силы. Для улучшения разделения часто используют температурный градиент.

При взаимодействии аминокислоты с нингидрином образуется продукт характерного фиолетового или желтого цвета. Аминокислоты, за

исключением иминокислот, образуют продукт фиолетового цвета, имеющий максимум поглощения при 570 нм. Иминокислоты, такие как пролин, образуют продукт реакции желтого цвета, имеющий максимум поглощения при 440 нм. Продукты постколоночной реакции между нингидрином и элюируемыми из колонки аминокислотами детектируются при длинах волн 440 нм и 570 нм, а полученная хроматограмма используется для определения аминокислотного состава.

Предел обнаружения для большинства производных аминокислот обычно составляет 10 пмоль, а для производных пролина – 50 пмоль. Линейность сигнала наблюдается в области 20 – 500 пмоль с коэффициентом корреляции более 0,999. Для получения удовлетворительных результатов рекомендуется использовать для гидролиза образцы белка/пептида массой более 1 мкг.

МЕТОД 2. Пост-колоночная дериватизация с о-фталевым альдегидом (ОФА)

о-Фталевый альдегид (ОФА) реагирует с первичными аминами в присутствии тиольных соединений, образуя производные изоиндола, обладающие сильной флуоресценцией. Эта реакция используется для пост-колоночной дериватизации в аминокислотном анализе методом ионообменной хроматографии. Основные подходы к ионохроматографическому разделению такие же, как указано в Методе 1.

Поскольку ОФА не взаимодействует с вторичными аминогруппами (иминокислоты, такие как пролин) с образованием флуоресцирующих производных, для образования флуоресцирующих производных с ОФА вторичные амины предварительно окисляют натрия гипохлоритом или хлорамином Т. В методике используются ионообменные колонки на основе сильных катионообменников для разделения свободных аминокислот с последующим пост-колоночным окислением натрия гипохлоритом или хлорамином Т и пост-колоночной дериватизацией с использованием ОФА и

тиольных соединений, таких как N-ацетил-L-цистеин или 2-меркаптоэтанол. Длительное воздействие натрия гипохлорита или хлорамина Т не оказывает заметного влияния на дериватизацию первичных аминокислот.

Разделение аминокислот на ионообменной колонке достигается подбором pH и ионной силы. После пост-колоночной дериватизации элюируемых аминокислот с ОФА продукты реакции проходят через флуориметрический детектор. Интенсивность флуоресценции ОФА-производных аминокислот измеряется при длине волны возбуждения 348 нм и длине волны эмиссии 450 нм.

Предел обнаружения для большинства ОФА-производных аминокислот обычно составляет несколько десятков пмоль. Линейность сигнала наблюдается в области от нескольких пмоль до нескольких десятков нмоль. Для получения удовлетворительных результатов рекомендуется использовать для гидролиза образцы белка/пептида массой более 500 нг.

МЕТОД 3. Предколоночная дериватизация с фенилизотиоционатом (ФИТЦ)

Фенилизотиоцианат (ФИТЦ) реагирует с аминокислотами с образованием фенилтиокарбамильных (ФТК) производных, которые детектируются с высокой чувствительностью при длине волны 254 нм.

После удаления реактива под вакуумом ФТК-производные аминокислот могут храниться в сухом состоянии в морозильнике в течение нескольких недель без заметной деградации. Готовый раствор пробы для анализа может храниться в течение 3 дней в холодильнике без заметных изменений хроматографического сигнала.

Разделение ФТК-производных аминокислот методом обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонке, заполненной октадецилсиликагелем, достигается путем подбора концентрации ацетонитрила в подвижной фазе и ионной силы буферного раствора. Элюируемые из колонки ФТК-производные аминокислот детектируются при длине волны 254 нм.

Предел обнаружения для большинства ФТК-производных аминокислот обычно составляет 1 пмоль. Линейность сигнала наблюдается в области 20 – 500 пмоль с коэффициентом корреляции более 0,999. Для получения удовлетворительных результатов рекомендуется использовать для гидролиза образцы белка/пептида массой более 500 нг.

МЕТОД 4. Предколоночная дериватизация с 6-аминохинолил-N-гидроксисукцинимидилкарбаматом (АХК)

АХК реагирует с аминокислотами с образованием стабильных флуоресцирующих несимметричных производных мочевины (АХК-аминокислот), которые определяют методом обращенно-фазовой ВЭЖХ с флуориметрическим детектированием.

Разделение АХК-производных аминокислот методом обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонке, заполненной октадецилсиликагелем, достигается подбором концентрации ацетонитрила в подвижной фазе и ионной силы буферного раствора. Селективное флуоресцентное детектирование производных при длине волны возбуждения 250 нм и при длине волны эмиссии 395 нм допускает прямой ввод реакционной смеси без существенного мешающего влияния единственного флуоресцирующего побочного продукта разложения АХК – 6-аминохинолина. Избыток реактива быстро гидролизуется ($t_{1/2} < 15$ с) с образованием 6-аминохинолина, N-гидроксисукцинимида и диоксида углерода, а через 1 мин образование производных становится невозможным.

Площади пиков для АКХ-аминокислот, не изменяются значимо, по меньшей мере, в течение 1 недели при хранении растворов при комнатной температуре. Следовательно, АХК-аминокислоты обладают более чем достаточной стабильностью для проведения круглосуточного автоматического хроматографического анализа. Предел обнаружения для

каждой аминокислоты, кроме цистеина, находится в области от 40 до 320 фмоль. Предел обнаружения для цистеина составляет около 800 фмоль. Линейность сигнала наблюдается в области 2,5 – 500 мкмоль с коэффициентом корреляции более 0,999. Для получения удовлетворительных результатов рекомендуется использовать для гидролиза образцы белка/пептида массой более 30 нг.

МЕТОД 5. Предколоночная дериватизация с о-фталевым альдегидом (ОФА)

ОФА в присутствии тиольных соединений реагирует с первичной аминогруппой, образуя производные изоиндола с сильной флуоресценцией. Метод не позволяет определять вторичные аминокислоты (иминокислоты, например, пролин). В качестве тиольных соединений могут быть использованы 2-меркаптоэтанол и 3-меркаптопропионовая кислота. ОФА не обладает флуоресценцией и, следовательно, не образует мешающих пиков на хроматограмме. Кроме того, его растворимость и стабильность в водном растворе, наряду с высокой скоростью реакции, позволяют проводить автоматическую дериватизацию с использованием программируемого автоматического инжектора (автосэмплера) для смешивания испытуемого образца и реагента (-ов). Основным недостатком ОФА является его неспособность реагировать с вторичными аминокислотами (например, пролином). Компенсировать данный недостаток можно сочетанием с методиками, описанными в методах 7 или 8.

За предколоночной дериватизацией аминокислот с ОФА следует дальнейшее разделение смеси ОФА-производных аминокислот методом обращенно-фазовой ВЭЖХ с последующим флуориметрическим детектированием. Так как ОФА-производные аминокислот неустойчивы, анализ методом ВЭЖХ проводят сразу после дериватизации. Использование программируемого автоматического инжектора для проведения дериватизации позволяет производить ввод проб в хроматограф строго через

равные промежутки времени после ее завершения, что минимизирует вариабельность получаемых результатов, связанную с нестабильностью ОФА-производных аминокислот во времени. Интенсивность флуоресценции ОФА-производных аминокислот измеряют при длине волны возбуждения 348 нм и длине волны эмиссии 450 нм.

Заявленный предел обнаружения при флуориметрическом детектировании составляет около 50 фмоль, однако на практике предел обнаружения остается на уровне 1 пмоль.

Реагентом-аналогом ОФА является 2,3-нафталиндиальдегид (НДА), который также успешно используется для предколоночной дериватизации аминокислот. Преимуществом НДА-производных аминокислот является их относительная стабильность по сравнению с ОФА-производными.

МЕТОД 6. Предколоночная дериватизация с (диметиламино)-азобензолсульфонилхлоридом (ДАБС-Cl)

Производные аминокислот с ДАБС-Cl (ДАБС-аминокислоты), обладают высокой стабильностью и имеют максимум поглощения при 436 нм в видимой области спектра. ДАБС-производные всех аминокислот белкового происхождения, могут быть разделены на колонке, заполненной октадецилсиликагелем, методом обращенно-фазовой ВЭЖХ с использованием градиентного элюирования и подвижной фазы, состоящей из ацетонитрила и водного буферного раствора.

Метод позволяет проводить с одинаковой чувствительностью анализ как аминокислот, так и иминокислот (таких как пролин). Метод дериватизации с ДАБС-Cl позволяет количественно определять остатки триптофана, полученные при гидролизе белка/пептида с сульфоновыми кислотами (такими как меркаптоэтансульфоновая, кислота п-толуолсульфоновая или метансульфоновая кислота) как указано в методе 2, описанном в разделе «Гидролиз белка». Другие лабильные остатки аминокислот, такие как аспарагин и глутамин, можно анализировать, как и

прежде, после их превращения, соответственно, в диаминопропионовую и диаминомасляную кислоты под действием бис-(1,1-трифторацетокси)-йодбензола, как указано в методе 11, описанном в разделе «Гидролиз белка».

В качестве внутреннего стандарта для этого метода не может быть использован норлейцин, так как его производное элюируется в области хроматограммы со скоплением пиков производных первичных аминокислот. В качестве внутреннего стандарта используют нитротирозин, который элюируется в свободной от пиков области хроматограммы.

Предел обнаружения ДАБС-аминокислот обычно составляет 1 пмоль. Предел количественного определения ДАБС-аминокислот составляет 2 – 5 пмоль. Для проведения одного анализа требуется всего лишь 10 – 30 нг дериватизированного ДАБС-Cl белкового гидролизата.

МЕТОД 7. Предколоночная дериватизация с 9-фторенилметилхлорформиатом

ФМОК-Cl взаимодействует с первичными и вторичными аминокислотами с образованием производных с сильной флуоресценцией. Реакция протекает в мягких условиях в водном растворе в течение 30 с. Получаемые производные аминокислот стабильны, за исключением производных гистидина, подвергающихся постепенной деградации. Несмотря на то, что ФМОК-Cl сам по себе обладает флуоресценцией, избыток реагента и флуоресцирующие побочные продукты реакции могут быть удалены из реакционной смеси без потерь ФМОК-производных аминокислот.

ФМОК-аминокислоты могут быть разделены на колонке, заполненной октадецилсиликагелем, методом обращенно-фазовой ВЭЖХ. Разделение проводят по программе градиентного элюирования с линейным изменением состава подвижной фазы от смеси «ацетонитрил : метанол : ацетатный буферный раствор» (10:40:50 (об./об./об.)) до смеси «ацетонитрил : ацетатный буферный раствор» (50:50 (об./об.)), что позволяет разделить 20

производных аминокислот в течение 20 мин. Элюируемые из колонки производные аминокислот детектируют при длине волны возбуждения 260 нм и длине волны эмиссии 313 нм.

Пределы обнаружения производных аминокислот находятся в нижнем фемтомолярном диапазоне. Линейность сигнала для большинства аминокислот наблюдается в области 0,1 – 50 мкмоль/л.

МЕТОД 8. Предколоночная дериватизация с 7-фтор-4-нитробензо-2-окса-1,3-диазолом (НБФ)

7-фтор-4-нитробензо-2-окса-1,3-диазолом (7-фтор-4-нитробензофуразан, НБФ) взаимодействует с первичными и вторичными аминокислотами с образованием производных с сильной флуоресценцией. Аминокислоты дериватизируются НБФ в течение 5 мин при температуре 60 °С.

НБФ-производные аминокислот могут быть разделены на колонке, заполненной октадецилсиликагелем, методом обращенно-фазовой ВЭЖХ с использованием программы градиентного элюирования и подвижной фазы, состоящей из ацетонитрила и водного буферного раствора. В результате 17 производных аминокислот разделяются в течение 35 мин. В качестве внутреннего стандарта может быть использована ε-аминокапроновая кислота, которая элюируется в свободной от пиков области хроматограммы. Элюируемые из колонки производные аминокислот детектируют при длине волны возбуждения 480 нм и длине волны эмиссии 530 нм.

Чувствительность этого метода почти такая же, как в предколоночной дериватизации с ОФА (метод 5), за исключением пролина, который не реагирует с ОФА (преимущественное отличие метода с НБФ). Предел обнаружения для каждой аминокислоты составляет около 10 фмоль. Анализ проводят с использованием 1,5 мг белкового гидролизата в предколоночной реакционной смеси.

МЕТОД 9. Использование масс-спектрометрического детектирования для определения производных аминокислот, полученных предколоночной дериватизацией.

Масс-спектрометрическое детектирование в режимах мониторинга по выделенным ионам (MS) или мониторинга множественных реакций (MS/MS) с электрораспылительной или химической ионизацией при атмосферном давлении позволяет проводить высокочувствительное и селективное определение производных аминокислот после предколоночной дериватизации с различными реагентами, описанными выше. Разделение производных аминокислот обычно осуществляется методом обращенно-фазовой ВЭЖХ в режиме градиентного элюирования при использовании элюентов на основе легколетучих компонентов (органические кислоты и их аммонийные соли, гидрокарбонат аммония, аммиак и алкиламины и пр.). Высокая селективность масс-спектрометрического детектирования позволяет выполнять экспрессный анализ сложных смесей аминокислот без необходимости достижения полноты разделения критичных пар и групп пиков. Пределы обнаружения производных аминокислот обычно составляют несколько нг/мл.

Использование масс-спектрометрического детектирования для определения нативных аминокислот также возможно, однако характеризуется значительно меньшей чувствительностью.

МЕТОД 10. Определение нативных аминокислот с импульсным амперометрическим детектированием

Аминокислоты в белковом/пептидном гидролизате разделяются ионохроматографически на колонке, заполненной гидрофобной полимерной анионообменной смолой с тетраалкиламмониевыми функциональными группами. Разделение проводят в градиентном режиме путем изменения концентрации гидроксид- и ацетат-ионов в водном элюенте. Детектирование аминокислот в элюате осуществляется при помощи импульсного

амперометрического детектора по току окисления между золотым рабочим электродом и комбинированным электродом сравнения (pH/Ag/AgCl). Развертка потенциала между рабочим электродом и электродом сравнения во времени осуществляется по специальной программе.

Пределы обнаружения аминокислот находятся в середине фемтомолярного – начале пикомолярного диапазона концентраций. Отклик детектора линеен в пределах 3 порядков концентрации аминокислот.

МЕТОД 11. Определение нативных аминокислот с испарительным детектором светорассеяния

Для разделения аминокислот используются методы ионообменной или ион-парной хроматографии с элюентами на основе легколетучих компонентов (органические кислоты и их аммонийные соли, гидрокарбонат аммония, аммиак и алкиламины, перфорированные органически килоты и пр.). Возможно также использование жидкостной хроматографии гидрофобных взаимодействий (HILIC).

В ионообменном варианте аминокислоты в белковом/пептидном гидролизате разделяются на сульфокатионообменной колонке в градиентном режиме элюирования. В качестве компонентов подвижной фазы для создания бинарного градиента по ионной силе и pH используются водные буферные растворы на основе ацетата аммония и трифторуксусной кислоты, что позволяет добиться разделения 18 протеиногенных аминокислот в течение 1 часа. Детектирование аминокислот выполняют при температуре испарительной трубки детектора 70 °C и скорости потока газа-носителя (азот) 1,5 л/мин. Пределы обнаружения аминокислот составляют от нескольких сотен пмоль до нескольких нмоль.

Альтернативным является использование ион-парного разделения аминокислот на колонке, заполненной октадецилсиликагелем. В качестве компонентов подвижной фазы для градиентного элюирования используются водный раствор, содержащий 0,1–0,5 % трифторуксусной кислоты и 0,2–

0,3 % гептафтормасляной кислоты, и метанол или ацетонитрил в качестве органического модификатора. Детектирование аминокислот выполняют при температуре испарительной трубки детектора 40-50 °С и скорости потока газа-носителя (азот) 2,5 л/мин. Пределы обнаружения аминокислот составляют от десятков до сотен нг.

Отклик испарительного детектора светорассеяния нелинейно зависит от концентрации аминокислот в растворе, для получения линейных калибровочных зависимостей используют билогарифмические координаты или используют нелинейную калибровку, аппроксимированную полиномом 2-ой степени.

Оптимальные (в рамках рассматриваемой аналитической задачи) параметры работы испарительного детектора светорассеяния (температуры испарительной трубки и распылителя, скорость потока (или давление) газа-носителя) могут варьироваться в зависимости от модели детектора и анализируемого образца и должны подбираться в ходе валидации методики аминокислотного анализа.

МЕТОД 12. Определение нативных аминокислот с детектором заряженного аэрозоля

Для разделения аминокислот в белковом/пептидном гидролизате используют те же варианты хроматогарфического разделения, что и при использовании испарительного детектора светорассеяния. Настройки детектора (температуру испарителя, давление газа-носителя) подбирают в зависимости от модели детектора и анализируемого образца в холе валидации методики. Пределы обнаружения аминокислот составляют от десятков до сотен нг.

Отклик детектора нелинейно зависит от концентрации аминокислот в растворе, для получения линейных калибровочных зависимостей используют билогарифмические координаты или используют нелинейную калибровку, аппроксимированную полиномом 2-ой степени. Детектор характеризуется

лучшей чувствительностью и более широким динамическим диапазоном по сравнению с испарительным детектором светорассеяния.

Проверка пригодности хроматографической системы

Хроматографические методики аминокислотного анализа, в зависимости от их направленности в рамках решаемой аналитической задачи (подтверждение подлинности, количественное определение, контроль примесей), должны соответствовать всем стандартным требованиям, предъявляемым к хроматографическим методикам контроля качества. В общем случае, главной особенностью аминокислотного анализа является необходимость одновременного определения большого числа аналитов, концентрации которых могут значительно (в десятки раз) отличаться друг от друга. Необходимость многокомпонентного определения накладывает жесткие требования к разрешающей способности хроматографической системы, которая в идеале должна обеспечивать полное разделение пиков определяемых соединений (аминокислот или их производных) за максимально короткое время. На практике достичь полного разделения пиков аминокислот (или их производных) между собой и с другими пиками (компоненты плацебо, мешающие вещества, избыток реагента и побочные продукты реакции) достаточно сложно, особенно в рамках экспрессной методики. Такие пары и группы пиков, для которых не удается добиться полного разделения (так называемые «критичные»), требуют пристального внимания при проверке пригодности хроматографической системы, а установленные нормы для разрешения между этими пиками должны быть тщательно валидированы.

Хроматографическая методика аминокислотного анализа должна включать в себя следующие пункты в рамках проверки пригодности хроматографической системы:

- проверку воспроизводимости (ОСО, %) и стабильности времен удерживания пиков аналитов и внутреннего стандарта на хроматограммах

стандартного раствора. Оценка воспроизводимости выполняется по серии последовательных вводов стандартного раствора в начале последовательности анализов, а оценка стабильности – по всем вводам стандартного раствора в последовательности. (контроль работы прибора)

- проверку воспроизводимости (ОСО, %) и стабильности площадей пиков внутреннего стандарта на хроматограммах стандартного раствора. Оценка воспроизводимости выполняется по серии последовательных вводов стандартного раствора в начале последовательности анализов, а оценка стабильности – по всем вводам стандартного раствора в последовательности. (контроль работы прибора и воспроизводимость процедуры дериватизации)
- проверку воспроизводимости (ОСО, %) и стабильности для отношения площади пика каждой аминокислоты к площади пика внутреннего стандарта. Оценка воспроизводимости выполняется по серии последовательных вводов стандартного раствора в начале последовательности анализов, а оценка стабильности – по всем вводам стандартного раствора в последовательности. (контроль процедуры дериватизации отдельных аминокислот и контроль стабильности отдельных производных).
- проверку факторов асимметрии пиков аналитов и внутреннего стандарта.
- проверку разрешения для пиков, образующих «критичные» пары и группы.
- проверку чувствительности для аналитов, концентрация которых близка к пределу количественного определения (нижней границе определяемых концентраций методики).
- проверку значений открываемости, рассчитанных для определяемых аминокислот в контрольном образце (белка / пептида или ином), если методика предусматривает использование контрольного образца.
- проверку чистоты холостой пробы от определяемых аминокислот.

Расчет и анализ полученных данных

При определении содержания аминокислот в белковом/пептидном гидролизате следует учитывать, что при кислотном гидролизе триптофан и цистеин разрушаются, серин и треонин разрушаются частично, в то время как связи по остаткам изолейцина и валина расщепляются не полностью. Метионин во время кислотного гидролиза может подвергаться окислению, а некоторые широко распространенные аминокислоты (например, глицин и серин) могут попасть в образец образца извне. Использование вакуума (менее 0,2 мм рт. ст., или 26,7 Па) или заполнение пространства реакционного сосуда инертным газом (аргон) может уменьшить степень окислительной деструкции в ходе парофазного гидролиза. По этим причинам результаты количественного определения, полученные для цистеина, триптофана, треонина, изолейцина, валина, метионина, глицина и серина в белковом/пептидном гидролизате могут быть непостоянными и потребуют дальнейших исследований.

Мольный процент аминокислоты – это количество остатков определенной аминокислоты на 100 остатков в белке. Эта величина может быть полезной при оценке данных, полученных при аминокислотном анализе, когда молекулярная масса исследуемого белка неизвестна. Информация также может быть использована для подтверждения подлинности белка/пептида или для других целей. Мольный процент каждой аминокислоты в испытуемом образце рассчитывают по формуле:

$$\frac{100r_U}{r},$$

где: r_U – молярная концентрация рассматриваемой аминокислоты (нмоль/мкл);

r – суммарная молярная концентрация всех аминокислот в испытуемом образце (нмоль/мкл).

Сравнение полученных в результате испытании мольных процентов аминокислот с известными данными для белков может помочь установить или подтвердить подлинность испытуемого образца белка.

Образцы неизвестного белка. Этот метод расчета может быть использован для оценки концентрации белка в образце неизвестного белка с использованием данных, полученных при аминокислотном анализе. Массу каждой высвобождаемой аминокислоты рассчитывают в микрограммах по формуле:

$$\frac{m \cdot M_r}{1000},$$

где: m – количество аминокислоты, определенное в испытании (нмоль);

M_r – средняя молекулярная масса данной аминокислоты, скорректированная с учетом массы молекулы воды отщепленной при образовании пептидной связи (г/моль).

Суммируя массы высвобожденных аминокислот, получают общую массу анализируемого белка после соответствующей коррекции с учетом частично или полностью разрушенных аминокислот. Если известна молекулярная масса неизвестного белка (например, определенная методом гель-электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия или методом масс-спектрометрии), можно предсказать аминокислотный состав неизвестного белка.

Число остатков каждой аминокислоты рассчитывают по формуле:

$$\frac{m}{(\frac{1000M}{M_{rt}})},$$

где: m – количество аминокислоты, определенное в испытании (нмоль);

M – общая масса белка (мкг);

M_{rt} – молекулярная масса неизвестного белка (г/моль).

Образцы известного белка. Этот метод расчета может быть использован для установления аминокислотного состава и концентрации

белка в образце белка известной молекулярной массы и аминокислотного состава с использованием данных, полученных при аминокислотном анализе. При анализе состава известного белка учитывают, что некоторые аминокислоты высвобождаются хорошо, в то время как значение открываемости, рассчитанное для других аминокислот, может значительно отличаться от 100 % вследствие полного или частичного разрушения (например, триптофан, цистеин, треонин, серин, метионин), неполного расщепления связей (например, изолейцин и валин), контаминации свободными аминокислотами (например, глицин и серин). По этой причине, количественного определения белка используют аминокислоты, значения открываемости, рассчитанные для которых, – наилучшие. Хорошо открываемыми аминокислотами обычно являются: аспартат-аспарагин, глутамат-глутамин, аланин, лейцин, фенилаланин, лизин и аргинин. Этот перечень может изменяться на основании наработанного собственного опыта по проведению аминокислотного анализа. Для количественного определения белка количество каждой хорошо открываемой аминокислоты в нмоль, делят на предполагаемое количество остатков этой аминокислоты в белке. Рассчитывают среднее значение содержания белка. Значения содержания белка, установленные по количеству каждой хорошо открываемой аминокислоты, должны быть равномерно распределены относительно среднего значения. В тех случаях, когда значения содержания белка, определенные по каким-либо из этих аминокислот, имеют неприемлемые отклонения (обычно более 5 %) от средней величины, их отбрасывают. С учетом оставшихся значений пересчитывают среднее содержание белка в испытуемом образце. Для определения аминокислотного состава испытуемого образца содержание каждой аминокислоты делят на рассчитанное среднее значение содержания белка. Относительную ошибку определения аминокислотного состава рассчитывают в процентах по формуле:

$$\frac{100m}{m_s},$$

где: m – экспериментально установленное количество аминокислоты (нмоль/аминокислотный остаток);

m_S – число аминокислотных остатков, соответствующих рассматриваемой аминокислоте, в составе белка;

M_{rt} – молекулярная масса неизвестного белка (г/моль).

Среднее значение относительной ошибки определения аминокислотного состава является средним значением абсолютных величин относительных ошибок определения каждой аминокислоты, исключая данные по триптофану и цистеину. Средняя величина относительной ошибки определения аминокислотного состава может дать важную информацию об устойчивости анализа во времени. Соответствие найденного аминокислотного состава образца белка и известного состава может служить подтверждением подлинности и чистоты белка в испытуемом образце.

Определение содержания общего органического углерода в воде для фармацевтического применения	**ОФС.1.2.1.0026.18**
	Вводится впервые

Настоящая общая фармакопейная статья предназначена для количественного определения содержания общего органического углерода в воде для фармацевтического применения. Общий органический углерод, присутствует в воде в виде органических соединений в растворенном и нерастворенном состоянии и является показателем ее качества Определение содержания общего органического углерода также проводится для оценки чистоты технологического оборудования, используемого при производстве лекарственных препаратов для фармацевтического применения.

Термины и определения

В настоящей общей фармакопейной статье применяются следующие термины и определения:

Общий углерод, ОУ – углерод, присутствующий в воде в виде органических и неорганических соединений, включая элементарный углерод;

Общий неорганический углерод, ОНУ – углерод, присутствующий в воде в виде неорганических соединений: карбонатов, гидрокарбонатов,

элементарного углерода, диоксида углерода (IV), оксида углерода (II), цианатов, цианидов и тиоцианатов;

Общий органический углерод, ООУ – углерод, присутствующий в воде в виде органических соединений в растворенном и нерастворенном состоянии.

Оборудование

Для определения общего органического углерода должно использоваться аттестованное оборудование - анализаторы ООУ, подключенное к производственной линии или работающее в автономном режиме. Оборудование должно быть зарегистрировано в государственном реестре средств измерений России. В инструкции по эксплуатации прибора должен быть указан предел обнаружения ООУ.

Общий принцип работы анализаторов ООУ основан на полном окислении органических соединений углерода, находящихся в исследуемом образце воды до образования углерода диоксида с последующим измерением его количества и вычислением концентрации ООУ в исследуемом образце воды.

Анализаторы, предназначенные для определения общего органического углерода должны различать общий органический углерод (ООУ) и общий неорганический углерод (ОНУ). Поддерживание низкого уровня ООУ в воде, предназначенной для фармацевтического применения позволяет обеспечить низкое содержание эндотоксинов, что является индикатором роста микроорганизмов.

Анализаторы ООУ, работающие в режиме on-line, могут непрерывно функционировать в автоматическом режиме путем подключения к информационной системе**.** Должна проводиться регулярная проверка работы анализаторов в соответствии с инструкцией по эксплуатации оборудования.

Установление градуировочной характеристики анализатора углерода, выражающей зависимость площади или высоты сигнала от содержания

углерода в пробе воды, проводят в соответствии с инструкцией по эксплуатации анализатора углерода.

Методика

Методика определения ООУ должна быть валидирована. Анализ воды для фармацевтического применения включает обработку образца кислотой и окисление до углерода диоксида, с последующим измерением количества углерода.

Процедура определения общего органического углерода проходит по общей схеме в три основных этапа:

1. ***Подкисление и продувка пробы для удаления неорганического углерода (ОНУ).*** Пробу подкисляют, как правило, 2 М раствором, хлористоводородной кислоты до значения pH 2-3. Обработка кислотой проводится для устранения углерода неорганического происхождения (ОНУ). При этом карбонаты и гидрокарбонаты образуют углерода диоксид, который удаляют путем продувания воздухом в виде CO_2.

2. ***Окисление оставшегося органического углерода до углерода диоксида.*** $C_{орг}$ + O_2 (окислительный агент) = CO_2. Окисление CO_2 в анализаторах ООУ может проводиться несколькими способами:

Термическое окисление:

- окисление проходит через прямое высокотемпературное сгорание при температуре от 800 до 1300 °С в присутствии катализаторов селена оксида или платины (Pt). Этот вид разложения эффективен для разрушения любого типа связей;

- каталитического окисления при температуре ~ 680°С в токе кислородсодержащего газа до углерода диоксида с использованием детектора инфракрасного излучения; *Ультрафиолетовое облучение (УФ) (фотоокисление).* Ультрафиолетовое облучение (УФ) обычной интенсивности при длине волны 254 нм или при длине волны 185 нм.

Примечание

Использование для окисления УФ - излучения с длиной волны 185 нм обеспечивает количественное окисление компонентов пробы даже без добавления калия персульфата.

Термохимическое окисление с добавлением калия персульфата.

3. Детектирование образующегося углерода диоксида

Регистрация ООУ осуществляется методом кондуктометрии или методом инфракрасной спектроскопии на максимальной полосе поглощения углерода диоксида, имеющего уникальную характеристическую полосу поглощения в инфракрасном диапазоне. Преимущество методики инфракрасной спектроскопии заключается в возможности точно настроить анализатор на полосу поглощения CO_2, в результате исключается влияние мешающих веществ и представляется возможность напрямую измерить уровень ООУ, получаемого в процессе окисления.

Порядок проведения измерений

Порядок проводимых измерений должен быть указан в инструкции по эксплуатации прибора. Как правило, измерения проводятся в следующей последовательности: раствор для проверки пригодности системы, стандартный раствор для определения чувствительности прибора, калибровочные растворы для установления градуировочных характеристик в соответствии с инструкцией по эксплуатации прибора и далее испытуемый образец воды. Все измерения фиксируются с помощью программного обеспечения ООУ – анализатора.

Результаты измерений

Первый вариант. Содержание ООУ вычисляется по результатам прямого измерения уровня ООУ или по разнице содержания общего углерода (ОУ) и общего неорганического углерода (ОНУ) с помощью программного обеспечения к анализатору углерода:

$$ООУ = ОУ - ОНУ$$

Второй вариант. Измеряют содержание ООУ на максимальной полосе поглощения углерода оксида методом инфракрасной спектроскопии.

Может быть использован другой подходящий валидированный метод, указанный в нормативной документации.

Испытуемый раствор выдерживает испытание, если значение ООУ испытуемого образца воды для фармацевтического применения не превышает значения разницы между показателями стандартного раствора (например, сахарозы), и воды, используемой в испытаниях для определения ООУ.

Примечания

Вода, используемая для определения ООУ. Вода для определения ООУ ($ООУ_{вода}$) должна соответствовать следующим требованиям: электропроводность – не более 1,0 мкСм при температуре 25 ^{o}C; содержание общего органического углерода - не более 0,1 мг/л.

ООУ воду используют для приготовления стандартных, калибровочных растворов, растворов для проверки пригодности системы.

Испытуемые образцы. Испытуемые образцы воды для определения ООУ отбирают в асептических условиях, используя емкости из воздухонепроницаемого материала с плотным укупориванием, оставляя минимальное воздушное пространство непосредственно перед проведением испытания.

Подготовка посуды. Методика подготовки лабораторной посуды, с применением средств, гарантирующих обеспечение удаления органических примесей должна быть изложена в нормативной документации с описанием приготовления моющего средства. Заключительное ополаскивание вымытой посуды проводят водой, используемой для определения ООУ.

Стандартный раствор. Должен содержать 0,5 мг/л углерода. Стандартный раствор готовят из раствора легкоокисляющегося вещества в ООУ воде с такой концентрацией, чтобы чувствительность прибора соответствовала измеряемому пределу содержания ООУ (например, самое легкоокисляющееся вещество – сахароза). Методика приготовления стандартного раствора должна быть изложена в нормативной документации.

Раствор для проверки пригодности системы. Должен содержать 0,5 мг/л углерода. Раствор готовят, по методике, указанной в инструкции по эксплуатации прибора, с использованием трудно окисляющегося вещества в ООУ воде (например, п-бензохинона).

Проверка пригодности системы. Проводят испытания следующих растворов: воды, используемой для определения ООУ (ООУ вода), стандартного раствора (Р ст.) и раствора для проверки пригодности системы

(Р сист.). Далее рассчитывают относительную эффективность отклика (чувствительность) прибора (Э отн.) в процентах по следующей формуле:

$$\text{Э отн.} = \frac{\text{Рсист.} - \text{ООУ вода}}{\text{Рст.} - \text{ООУ вода}} \cdot 100$$

На основании полученных результатов система считается пригодной, если эффективность отклика прибора составляет не менее 85 % и не более 115 % от теоретического отклика.

Калибровочные растворы. Готовят соответствующие калибровочные и другие растворы, указанные в инструкции по эксплуатации прибора для регулирования калибровки прибора в автоматическом режиме.

Термический анализ **ОФС.1.2.1.0027.18**

Вводится впервые

Настоящая общая фармакопейная статья является обобщающей и распространяется на методы, при помощи которых изменение физической характеристики вещества определяется, как функция от температуры. В ОФС представлены наиболее распространенные методы измерения изменения массы (термогравиметрия) и энергии (дифференциальная сканирующая калориметрия, дифференциальный термический анализ) в зависимости от температуры, а также метод термомикроскопии.

Метод 1. Термогравиметрия

Термогравиметрия – метод термического анализа, при котором регистрируется изменение массы исследуемого образца в зависимости от температуры.

Область применения

Термогравиметрический анализ обычно используется для измерения температуры деградации полимеров, потери массы при высушивании, для исследования полиморфных модификаций фармацевтических субстанций, кроме того термогравиметрия в комбинации с некоторыми другими физико-химическими методами рекомендована для изучения сольватов (ОФС «Полиморфизм»).

Оборудование

Прибор для термогравиметрии состоит из следующих узлов:

- программируемый нагревательный элемент;

- герметичная камера с контролируемой температурой атмосферы;

- электронные весы;

- регистрирующее устройство.

Для подготовки прибора к работе необходимо провести калибровку температурной шкалы и калибровку весов. Для калибровки весов обычно используют стандартный образец кальция оксалата моногидрата, однако возможно использование других стандартных образцов. Установленное количество стандартного образца помещают в камеру для нагревания. Программируют скорость и параметры нагрева в соответствии с методикой изготовителя, и начинают нагревание вещества. Регистрация результата представляется в виде графика зависимости массы вещества от значения температуры. Далее измеряют разницу в массе между начальной и конечной точкой нагревания и сравнивают полученную величину с аналогичным показателем стандартного образца.

Методика

Условия проведения анализа указывают в фармакопейной статье. Потерю в массе при нагревании исследуемого образца ($\Delta m/m$) определяют по начальному и конечному плато на термогравиметрической кривой. Также необходимо указывать

Метод 2. Дифференциальный термический анализ, дифференциальная сканирующая калориметрия.

Дифференциальный термический анализ (ДТА) и дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК) – это группа методов термического анализа, основанных на измерении энергетических явлений во время нагревания образца. Методы используются для определения разницы в тепловых потоках выделенных или поглощенных испытуемым образцом по отношению к стандартному образцу в зависимости от температуры.

Область применения

Данные методы используют для изучения исследования полиморфизма, а также для изучения фазовых переходов. Кроме того, дифференциальная сканирующая калориметрия может применяться для определения содержания примесей в веществе по одной термограмме.

Оборудование

Для ДТА используют прибор, измеряющий тепловой поток. Прибор обеспечивает постоянную скорость нагревания образцов и определяет температурный дифференциал, как различие тепловых потоков исследуемого и стандартного образцов. Он состоит из печи, в которой находится одна ячейка для исследуемого образца и для образца сравнения. В приборе для ДСК используется печь с двумя отдельными ячейками для исследуемого образца и образца сравнения. В этом приборе с помощью компенсации энергии. Оба прибора также состоят из следующих узлов: программируемая система нагревания образцов, тепловой детектор, система регистрации данных. Камера прибора снабжена контролируемой атмосферой. Оба прибора необходимо откалибровать по температуре и изменению энтальпии. В качестве стандарта для калибровки используется материал, указанный в инструкции изготовителя (часто используют индий высокой степени очистки).

Методика

Условия проведения анализа указывают в фармакопейной статье. Взвешивают соответствующее количество исследуемого вещества в тигле, помещают в держатель. Параметры нагрева (начальная и конечная температуры, скорость нагревания) устанавливают согласно указаниям в фармакопейной статье. Начинают анализ и регистрируют дифференциальную термическую кривую (рис.1) зависимости энергии от температуры или времени, попутно определяя эндотермичность или экзотермичность изменения. Температура начала соответствует пересечению базовой линии с касательной в точке перегиба кривой. Концом теплового явления считается

экстремум кривой. Энтальпия явления пропорциональна площади под пиком, ограниченной базовой линией. Коэффициент пропорциональности для расчета абсолютного значения энтальпии, определяют, измеряя температуру плавления известного вещества в тех же условиях.

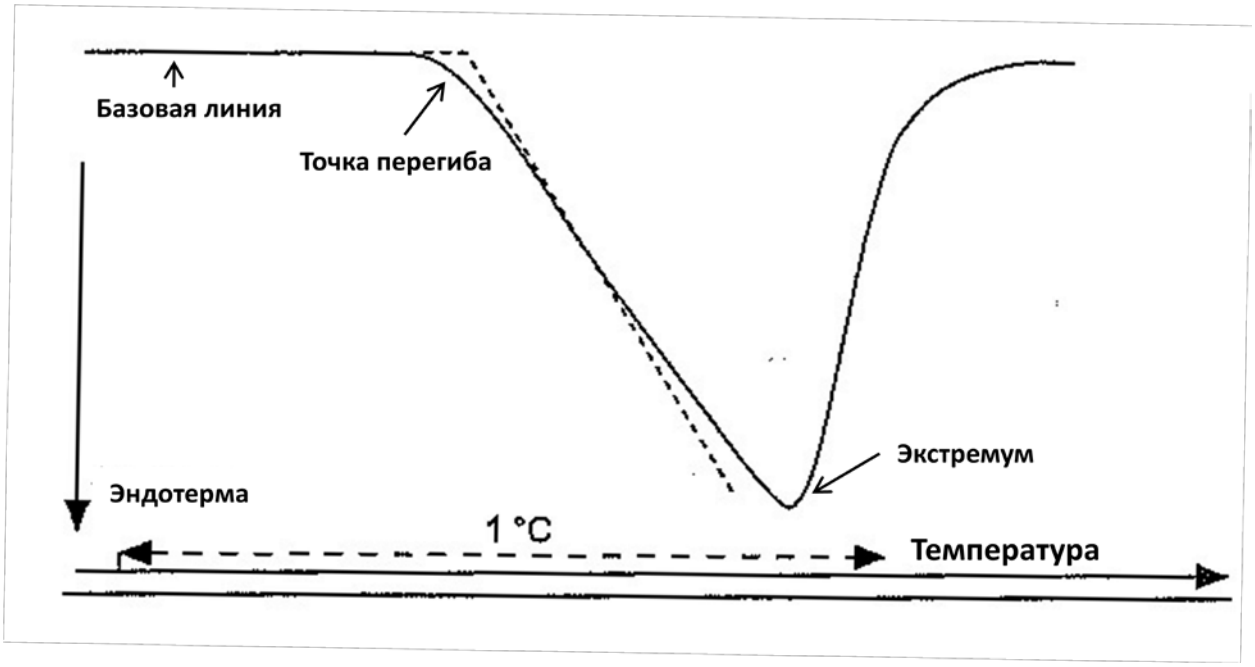


Рис. 1 – Дифференциальная термическая кривая (термограмма).

Для получения корректных данных каждая термограмма должна сопровождаться условиями проведения измерений, отчетом о калибровке, количеством образца, данными о хранении, параметрами прибора (чувствительность прибора и регистрирующего устройства, параметры нагревательного элемента и т.д.)

Дифференциальный термический анализ может применяться для разных целей. Например, для изучения *фазовых переходов*. Для этого определяется изменение теплоемкости и энтальпии фазовых переходов, которым подвергается вещество, как функции температуры. В фазовом переходе твердое тело – твердое тело выделяют аллотропию – полиморфизм, стеклование, аморфнокристаллический переход, десольвацию. Переход жидкость – твердое тело делится на замерзание и кристалличность. Полученные данные используются для построения фазовых диаграмм,

которые в свою очередь используются для определения предварительного состава.

Чаще всего дифференциальный термический анализ используется для определения чистоты исследуемого вещества. Этот метод позволяет по одной термограмме определить с помощью измерения точки плавления и теплоты плавления процентное содержание примесей в исследуемом образце. Плавление чистого кристаллического вещества при постоянном давлении характеризуется теплотой плавления ΔH. Чем чище вещество, тем уже пик соответствующий точке плавления T_0 на термограмме, а степень расширения основания термической кривой служит надежным индикатором примесей. Для определения молярной чистоты исследуемого образца методом ДСК используют концентрационное уравнение Вант Гоффа в интегральной форме.

$[ln(1-x) = -x$ и $T \times {T_0}^2]$, где

$$T = T^0 - \frac{R{T_0}^2}{\Delta H} \times x,$$

x – количество вещества в жидкой или твердой фазе при Т (в К), моль

T_0 – эталонная температура плавления чистого вещества, К

ΔH – молярная температура плавления, Дж

R – универсальная газовая постоянная для идеальных газов, Дж·К$^{-1}$·моль$^{-1}$

С помощью этого метода реально определять примеси, содержанием не более 1,5-2 % от общего количества. Кроме того, применимость этого метода определения примесей ограничена природой исследуемого образца. Так этот метод неприменим для аморфных веществ, сольватов или полиморфов, примесей, образующих твердые растворы с основным веществом, нерастворимых примесей.

Поскольку выше температуры эвтектики смеси твердая фаза содержит только чистое вещество, при дальнейшем увеличении температуры мольная фракция примеси в жидкой фазе постоянно уменьшается из-за плавления чистого вещества.

Для всех температур выше точки эвтектики справедливо выражение:

$x = \frac{1}{F} x_2$, где

F – расплавленная фракция испытуемого образца,

x_2 – мольная фракция примеси в испытуемом образце.

Соответственно, с повышением температуры F стремится к единице, а x к x_2. Общее уравнение выглядит:

$$T = T^0 - \frac{x_2 \times R \times {T_0}^2}{\Delta H} \times \frac{1}{F}$$

Величину теплоты плавления рассчитывают с помощью интегрирования пика плавления (площадь под пиком). Температура плавления T_0 экстраполируется из графика. Общее количество примесей получается умножением x_2 на 100%.

Метод 3. Термомикроскопия.

Термомикроскопия – метод термического анализа, визуализирующий фазовые переходы исследуемого вещества. Метод основан на микроскопическом исследовании образца, подвергнутого программируемому нагреванию, в поляризованном свете.

Область применения

Данный метод обычно используется в комплексе с термогравиметрией или дифференциальным термическим анализом для определения температур фазового перехода.

Оборудование

Прибор состоит из оптического микроскопа, оснащенного источником поляризованного света, нагревательного элемента с возможностью программируемого нагревания и охлаждения, системы регистрации температур фазового перехода.

Методика

Методика микроскопии является стандартной для микроскопических методов.

Молекулярно-массовое распределение декстранов	**ОФС.1.2.1.0028.18** **Вводится впервые**

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на метод изучения молекулярно-массового распределения и определения средней молекулярной массы декстранов 40, 60 и 70. Определение проводят методом гель-фильтрационной хроматографии в соответствии с ОФС «Эксклюзионная хроматография» и согласно условиям, описанным ниже.

Методика

Испытуемый раствор. Раствор испытуемого декстрана в подвижной фазе с концентрацией 20 мг/мл.

Маркерный раствор для определения рабочего объема колонки. 5 мг глюкозы и 2 мг СО высокомолекулярного декстрана ($M_w \approx 2000$ кДа) растворяют в 1 мл подвижной фазы.

Калибровочные растворы. Из отдельных навесок СО декстранов для калибровки с различными молекулярными массами готовят серию калибровочных растворов в подвижной фазе (концентрация декстрана 20 мг/мл), соответствующих калибровочному диапазону для среднемассовой молекулярной массы от 4 до 250–270 кДа. Серия калибровочных растворов должна включать в себя не менее 5 растворов, приготовленных с использованием узкодисперсных СО декстранов для калибровки,

охарактеризованных по значениям среднемассовой молекулярной массы (M_w) и массы, соответствующей максимуму хроматографичекого пика ($M_{макс.}$, M_p).

Раствор для проверки пригодности системы. Раствор СО декстрана 40 для проверки пригодности системы, или СО декстрана 60/70 для проверки пригодности системы, или СО декстрана 70 для проверки пригодности системы (в соответствии с испытуемым декстраном) в подвижной фазе с концентрацией 20 мг/мл.

Условия хроматографического анализа.

Подвижная фаза: 7,1 г/л (50 мМ) раствор натрия сульфата безводного в воде с добавкой 0,2 г/л (0,02 %) натрия азида.

Детектирование: дифференциальное рефрактометрическое.

Температура оптического блока детектора: 40 °С.

Хроматографические колонки: три последовательно соединенные хроматографические колонки (длина 300 мм, внутренний диаметр 7,5–8 мм), заполненные частицами гидроксилированного полиметакрилата (7–17 мкм): две колонки, заполненные частицами диаметром 10–17 мкм (размер пор 1000 Å; предел эксклюзии, определенный по декстрану, ≈ 2500–4000 кДа), одна колонка, заполненная частицами диаметром 7–17 мкм (размер пор 200 Å; предел эксклюзии, определенный по декстрану, ≈ 60–100 кДа).

Скорость потока подвижной фазы: 0,5–1,0 мл/мин.

Температура колонок: 25 °С.

Объем вводимой пробы: 50–100 мкл.

Время хроматографирования: в 1,1 раза больше времени удерживания пика глюкозы на хроматограмме маркерного раствора для определения рабочего объема колонки.

Калибровка системы

Хроматографируют маркерный раствор для определения рабочего объема колонки, получая не менее 3 последовательных хроматограмм. На хроматограмме должны присутствовать два основных пика: первый пик соответствует высокомолекулярному декстрану, второй пик соответствует глюкозе. Объем элюирования пика высокомолекулярного декстрана (определенный в вершине пика) соответствует «мертвому» объему колонки (V_0), а объем элюирования пика глюкозы соответствует полному объему элюента в колонке (V_t).

Хроматографируют каждый из калибровочных растворов. На каждой полученной хроматограмме аккуратно интегрируют пик декстрана. Каждый пик декстрана, а также пик глюкозы на хроматограмме маркерного раствора для определения рабочего объема колонки, делят равноудаленными перпендикулярами на p частей ($p \geq 60$), соответствующих равным объемам элюирования. Разбиение пиков на части и все последующие расчеты молекулярно-массового распределения, согласно представленному ниже алгоритму, выполняют, используя специализированное программное обеспечение в автоматическом режиме.

Для каждой i-ой части пика ($i \in [1, p]$), соответствующей объему элюирования V_i, измеряют высоту (y_i) от базовой линии хроматограммы и рассчитывают коэффициент распределения (K_i) по формуле (1):

$$K_i = \frac{V_i - V_0}{V_t - V_0}, \quad (1)$$

где V_0 – «мертвый» объем (предел эксклюзии) колонки, определенный по пику высокомолекулярного декстрана на хроматограмме маркерного раствора для определения рабочего объема колонки;

V_t – полный объем элюента в колонке, определенный по пику глюкозы на хроматограмме маркерного раствора для определения рабочего объема колонки;

V_i – объем элюирования i-ой части пика декстрана на хроматограммах каждого из калибровочных растворов (или i-ой части пика глюкозы на хроматограмме маркерного раствора для определения рабочего объема колонки).

Аналогичным образом для пиков каждого из калибровочных декстранов и глюкозы по формуле (1) рассчитывают коэффициент распределения $K_{\text{макс.}}$, соответствующий вершине пика. Используя подходящее программное обеспечение строят зависимость полученных значений $K_{\text{макс.}}$ (ось абсцисс) от заявленной молекулярной массы в максимуме пика ($M_{\text{макс.}}$) каждого из декстранов, использованных для калибровки, и глюкозы (ось ординат). Полученную зависимость аппроксимируют уравнением вида (2). Используя значения K_i, рассчитанные по уравнению (1) для соответствующих частей пиков калибровочных декстранов и глюкозы, вычисляют значения M_i, а затем, значения M_{w} по уравнениям (2) и (3).

$$M_i = b_5 + e^{(b_4 + b_1 K_i + b_2 K_i^2 + b_3 K_i^3)}, \qquad (2)$$

$$\overline{M}_{\text{w}} = \frac{\sum_{i=1}^{p} y_i M_i}{\sum_{i=1}^{p} y_i}, \qquad (3)$$

где p – число частей, на которые поделен хроматографический пик;

y_i – высота i-ой части пика над базовой линией;

M_i – молекулярная масса i-ой части пика;

$\overline{M}_{\text{w}}$ – расчетное значение среднемассовой молекулярной массы.

Рассчитанные значения $\overline{M}_{\text{w}}$ для калибровочных декстранов и глюкозы сравнивают с паспортными значениями. При необходимости, используя подходящие программное обеспечение и алгоритм аппроксимации калибровочной кривой нелинейным методом наименьших квадратов (например, методом Гаусса-Ньютона), выполняют итерационный подбор коэффициентов b_1–b_5 в уравнении (2), добиваясь выполнения условий пригодности калибровки (см. раздел «Проверка пригодности системы и калибровки»).

Проверка пригодности системы и калибровки

Хроматографируют раствор для проверки пригодности системы и рассчитывают значение среднемассовой молекулярной массы декстрана по уравнениям (2) и (3), как описано выше.

Рассчитывают среднемассовую молекулярную массу 10 % высокомолекулярной фракции декстрана по уравнению (4):

$$\overline{M}_{\mathrm{w}} = \frac{\sum_{i=1}^{n} y_i M_i}{\sum_{i=1}^{n} y_i}, \text{ где} \qquad (4)$$

n определяется из выражений (5) и (6):

$$\sum_{i=1}^{n} y_i \leq 0.1 \sum_{i=1}^{p} y_i \ , \qquad (5)$$

$$\sum_{i=1}^{n+1} y_i > 0.1 \sum_{i=1}^{p} y_i \ , \qquad (6)$$

где p – число частей, на которые поделен хроматографический пик;

y_i – высота i части пика над базовой линией;

M_i – молекулярная масса i части пика.

Рассчитывают среднемассовую молекулярную массу 10 % низкомолекулярной фракции декстрана по уравнению (7):

$$\overline{M}_{\mathrm{w}} = \frac{\sum_{i=m}^{p} y_i M_i}{\sum_{i=m}^{p} y_i}, \text{ где} \qquad (7)$$

n определяется из выражений (8) и (9):

$$\sum_{i=m}^{p} y_i \leq 0.1 \sum_{i=1}^{p} y_i \ , \qquad (8)$$

$$\sum_{i=m-1}^{p} y_i > 0.1 \sum_{i=1}^{p} y_i \ ,$$

(9)

где p – число частей, на которые поделен хроматографический пик;

y_i – высота i части пика над базовой линией;

M_i – молекулярная масса i части пика.

Хроматографическая система и калибровка считаются пригодными, если:

– относительное стандартное отклонение для значений V_0, V_t и отношения V_0/V_t, рассчитанное по серии последовательных хроматограмм ($n \geq 3$) раствора для определения рабочего объема колонки не превышает 1 %;

– фактор асимметрии, рассчитанный для пика глюкозы, не превышает 1,3;

– рассчитанные значения $\overline{M}_w$ отличаются от соответствующих сертифицированных значений M_w в пределах ± 5 % для каждого стандартного образца декстрана, а расчетное значение M_w глюкозы составляет 180 ± 2 Да. При этом среднее значение отклонения $\overline{M}_w$ декстранов, рассчитанное из модулей индивидуальных отклонений, не должно превышать 3 %;

– полученное значение среднемассовой молекулярной массы декстрана для проверки пригодности системы лежит в пределах от 39000 до 47000 Да в случае СО декстрана 40 для проверки пригодности; от 67000 до 75000 Да в случае СО декстрана 60/70 для проверки пригодности и от 65000 до 74000 Да в случае СО декстрана 70 для проверки пригодности;

– полученное значение среднемассовой молекулярной массы 10 % высокомолекулярной фракции декстрана для проверки пригодности системы лежит в пределах от 110000 до 135000 Да в случае СО декстрана 40 для проверки пригодности; от 190000 до 230000 Да в случае СО декстрана 60/70 для проверки пригодности и от 180000 до 240000 Да в случае СО декстрана 70 для проверки пригодности;

– полученное значение среднемассовой молекулярной массы 10 % низкомолекулярной фракции декстрана для проверки пригодности системы лежит в пределах от 6000 до 9000 Да в случае СО декстрана 40 для проверки пригодности; от 7000 до 11000 Да в случае СО декстрана 60/70 для проверки пригодности и от 7000 до 11000 Да в случае СО декстрана 70 для проверки пригодности;

Молекулярно-массовое распределение испытуемого декстрана

Хроматографируют испытуемый раствор, определяют значение среднемассовой молекулярной массы (M_w) по уравнениям (2) и (3) и значения M_w для 10 % высокомолекулярной и 10 % низкомолекулярной фракций декстрана по уравнениям (4)–(6) и (7)–(9) соответственно.

Спектрометрия в ближней инфракрасной области	**ОФС.1.2.1.1.0001.15** **Вводится впервые**

Спектрометрия в ближней инфракрасной (БИК) области – метод, основанный на способности веществ поглощать электромагнитное излучение в диапазоне длин волн от 780 до 2500 нм (от 12500 до 4000 см-1).

Поглощение в БИК диапазоне связано, как правило, с обертонами основных колебательных частот связей C–H, N–H, O–H и S–H и их комбинациями. Наиболее информативным диапазоном является область от 1700 до 2500 нм (от 6000 до 4000 $см^{-1}$).

Для спектрометрии в БИК области характерны простота подготовки проб или отсутствие пробоподготовки, быстрота измерений, неразрушающий характер анализа (без вскрытия упаковки лекарственного препарата), одновременная оценка нескольких параметров (показателей), проведение дистанционного контроля, в том числе в технологических потоках в режиме реального времени.

БИК-спектрометрия позволяет прямо или косвенно проводить качественную и количественную оценку химических, физических и физико-химических характеристик анализируемого объекта, в том числе:

– содержание воды и органических растворителей;

– гидроксильное и йодное число, степень гидроксилирования;

– кристаллическую форму и степень кристалличности;

– полиморфную форму или псевдополиморфную форму;

– дисперсность частиц и другие.

Анализ информации, извлекаемой из БИК-спектров, проводится с применением хемометрических алгоритмов.

Оборудование

БИК-спектрометры состоят из:

– источника излучения, например, кварцевой лампы (лампы накаливания) или ее аналога;

– монохроматора (дифракционная решетка, призма, оптико-акустический фильтр) или интерферометра (для Фурье-спектрометров);

– регистрирующего устройства – детектора (на основе кремния, сульфида свинца, арсенида индия, арсенида индия-галлия, теллурида ртути-кадмия, дейтерированного триглицина сульфата и др.);

– устройства размещения образца и/или дистанционного оптоволоконного зонда.

Спектрометры могут быть оснащены кюветным отделением, интегрирующей сферой (интегрирующая сфера представляет собой оптический компонент, состоящий из сферической полости с покрытием из хорошо отражающего материала, сфера предназначена для получения спектров отражения неоднородных образцов), внешними модулями для измерения пропускания сильно рассеивающих образцов, устройствами автоматической подачи образцов, оптоволоконными зондами и т.д. Выбор того или иного приспособления для анализа зависит от типа образца и выбранного способа измерения.

Для размещения образцов используют стеклянные или кварцевые кюветы, флаконы, стеклянные стаканы, держатели капсул или таблеток и другие приспособления.

Обработка данных и анализ полученных результатов проводится с использованием специального программного обеспечения.

Для каждого режима измерения (пропускание, диффузное отражение и их комбинация) должна быть предусмотрена своя методика проверки,

включающая проверку точности и воспроизводимости волновой шкалы, линейности, стабильности откликов и фотометрического шума.

Проверка точности волновой шкалы. Для проверки точности волновой шкалы регистрируют спектр стандарта, имеющего характеристические максимумы и минимумы поглощения, и сравнивают полученные значения длин волн с заявленными характеристиками. В качестве стандартов используют оксиды редкоземельных элементов, пары воды в атмосфере, метиленхлорид и другие.

В приборах с Фурье-преобразованием шкала волновых чисел линейна во всем рабочем диапазоне, и для проверки точности волновой шкалы достаточно использовать один стандарт с контролем заявленных характеристик по одной полосе поглощения. Приборы других типов могут иметь нелинейный характер шкалы волновых чисел и требуют проверки заявленных метрологических характеристик не менее чем по трем пикам (один или несколько стандартов) с охватом всего рабочего диапазона.

Погрешность при установке длин волн должна быть не более ± 1 нм (или эквивалентная ему величина волнового числа) в диапазоне длин волн до 1900 нм и не более ± 1,5 нм для диапазона длин волн ≥ 1900 нм.

Воспроизводимость установки длины волны должна соответствовать требованиям завода-изготовителя или требованиям нормативных документов, действующих на территории Российской Федерации.

Проверка фотометрической линейности и стабильности откликов. Для проверки фотометрической линейности регистрируют БИК-спектры стандартов с известными значениями пропускания или отражения и строят графическую зависимость полученных значений пропускания или отражения от известных значений. Результатом построения такой зависимости должна являться прямая линия с отсечением (0,00 ± 0,05) и тангенсом угла наклона прямой (1,00 ± 0,05).

Для проверки фотометрической линейности в режиме отражения в качестве стандартов используются полимеры, допированные углеродом, или

аналоги. Если прибор используется для измерения образцов с поглощением 1,0 и менее, то достаточно использовать 4 стандарта в диапазоне значений отражения от 10 до 90 %, например, 10, 20, 40 и 80% с соответствующими значениями поглощения 1,0; 0,7; 0,4 и 0,1. При измерении образца с поглощением выше 1,0 к указанному набору стандартов добавляют стандарт отражения 2 и/или 5 %.

Для проверки фотометрической линейности в режиме пропускания в качестве стандартов используют 3 фильтра со значениями пропускания в области от 10 до 90 % и линию 100 % пропускания, т.е. регистрируют спектр пропускания пустого канала.

Для проверки стабильности отклика периодически проводят измерение стандарта с неизмененными физическими и химическими свойствами. Измерение фона должно проводиться с помощью одного и того же внутреннего или внешнего стандарта. Отклонение фотометрического отклика не должно превышать ± 2 %.

Проверка фотометрического шума. Для оценки фотометрического шума при измерении пропускания записывают линию 100 % по воздуху; при измерении отражения регистрируют линию 100 % с применением подходящих стандартов с отражением не менее 99 %. При этом под линией 100 % подразумевается измерение, при котором стандарт является измеряемым образцом и фоном одновременно. При высоких значениях поглощения проводят оценку фотометрического шума с применением стандартов со значениями пропускания или отражения около 10 %.

Фотометрический шум должен соответствовать требованиям, указанным в спецификации производителя.

Способы измерения

БИК-спектр представляет собой зависимость соответствующей фотометрической величины [оптической плотности (*A*), коэффициента пропускания (*T*), коэффициента отражения (*R*) и производных величин] от длины волны или частоты излучения. При измерениях в БИК области

реализуются следующие способы:

– измерение пропускания (или поглощения) при прохождении излучения через образец;

– измерение излучения, отраженного или рассеянного от образца;

– комбинация вышеуказанных способов.

Измерения всегда проводят относительно фона.

Измерение пропускания. Пропускание является мерой снижения интенсивности излучения при прохождении через образец. Этот принцип реализован в большинстве используемых спектрометров, и результат может быть представлен непосредственно в единицах пропускания (T) и/или оптической плотности (A).

$$T = \frac{I}{I_0},$$

где I_0 – интенсивность падающего света;

I – интенсивность света, прошедшего через образец;

$$A = -\log_{10}(T) = \log_{10}\left(\frac{1}{T}\right) = \log_{10}\left(\frac{I_0}{I}\right).$$

В качестве фона используют спектр воздуха или среды сравнения.

Способ применим для твердых и жидких проб, в том числе для дисперсных систем.

Специальной подготовки проб при измерении пропускания, как правило, не требуется. Для измерения спектра жидких образцов используют флаконы или кюветы с подходящей длиной оптического пути (обычно 0,5 – 22 мм), а также оптоволоконные зонды со специальной насадкой.

Диффузное отражение. В методе диффузного отражения измеряют коэффициент отражения (R), представляющий отношение интенсивности света, отраженного от образца (I), к интенсивности света, отраженного от фона (I_r):

$$R = \frac{I}{I_r},$$

или обратную логарифмическую величину этого отношения (A_R):

$$A_R = \lg\left(\frac{1}{R}\right) = \lg\frac{I_r}{I}.$$

В качестве фона используют поверхность с высокой величиной R: пластины из золота, перфторированных насыщенных полимеров, керамические пластины и другие подходящие материалы.

Способ используется для анализа твердых образцов с применением интегрирующей сферы или оптоволоконных зондов, работающих в режиме отражения. В последнем случае для воспроизводимости получаемых результатов необходимо обеспечить стабильность условий проведения измерений, в частности относительную неподвижность зонда, степень соприкосновения датчика с образцом и другие условия.

Пропускание – отражение. Данный способ является комбинацией пропускания и отражения благодаря специальной конструкции кювет и датчиков, в которых излучение дважды проходит через образец, что позволяет анализировать образцы с низкой поглощающей и рассеивающей способностью.

В качестве фотометрической величины используют коэффициент двойного пропускания (T*):

$$T^* = \frac{I}{I_T},$$

где I_T – интенсивность излучения после двойного пропускания, без образца;

I – интенсивность пропущенного и отраженного излучения, измеренная с образцом;

и величину, аналогичную оптической плотности (A*):

$$A^* = \lg\left(\frac{1}{T^*}\right).$$

В качестве фона используют спектр воздуха или среды сравнения.

Способ применим для жидких, в том числе негомогенных проб.

Для регистрации спектра исследуемый образец помещают в кювету с зеркалом или другим диффузным отражателем. Возможно использование оптоволоконного зонда со специальной насадкой, который погружают в образец.

Факторы, влияющие на результаты измерений

Температура образца. Температура образца может влиять как на его пропускание, так и на его отражение. Контроль температуры важен при анализе термически лабильных объектов, в случае которых разница в несколько градусов может приводить к существенным спектральным изменениям, в том числе твердых образцов, содержащих воду, дисперсных систем, аморфных объектов и прочее.

Влага и остаточные количества растворителей. Наличие воды и остаточных количеств растворителей может оказать влияние на характер спектра и результаты анализа. Необходимость и условия высушивания должны быть указаны в фармакопейных статьях.

Толщина образца определяет степень пропускания. С увеличением толщины слоя наблюдается увеличение поглощения. Поэтому при сравнительных измерениях пропускания толщина образца должна быть одинаковой или учитываться. При измерении отражения толщина слоя не имеет принципиального значения, но нужно учитывать, что толщина слоя должна быть сопоставимой с глубиной проникновения луча в образец. В случае недостаточной толщины за образцом ставится дополнительный рефлектирующий материал, например штамп с золотым покрытием.

Оптические свойства образца. При анализе твердых образцов необходимо обеспечивать максимально возможную однородность пробы, так как различия в плотности или размерах частиц сказываются на характере спектра. Спектры физически, химически или оптически гетерогенных образцов следует регистрировать либо с увеличенным размером пучка света, либо используя устройства, вращающие образцы во время измерений. При этом желательно проводить измерения каждого образца несколько раз с

последующим усреднением спектров.

Полиморфизм. Разница в кристаллической структуре (полиморфизм) оказывает влияние на спектр, что позволяет отличать друг от друга кристаллические или аморфные формы на основании их БИК-спектров. При проведении анализа необходимо учитывать кристаллическую структуру (модификацию) эталонного спектра, используемого в методе анализа.

Возраст образцов. Свойства образцов могут изменяться во времени, и эти изменения могут обуславливать спектральные различия для одних и тех же образцов. Данные изменения должны быть учтены при построении калибровочных моделей, как для целей идентификации, так и для целей количественного анализа.

КАЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ

Качественный анализ (квалификация и идентификация) в БИК-спектрометрии основан на схожести спектров одного и того же вещества.

Для проведения качественного анализа первоначально создают библиотеку стандартных спектров, подбирают оптимальную математическую модель для обработки спектров и реализации алгоритмов их сравнения. Далее проводят валидацию библиотеки в совокупности с выбранной математической моделью (см. раздел «Валидация качественных методов»). Качественный анализ проводят путем сравнения спектра испытуемого образца со спектрами в библиотеке (см. раздел «Анализ данных»).

Создание библиотеки спектров. Библиотека представляет совокупности спектров, содержащих характеристическую информацию о каждом объекте анализа. Для каждой совокупности спектров при помощи соответствующих методов и алгоритмов определяют оптимальные параметры идентификации. Заданные установки действительны для всей библиотеки. Для близких объектов, неразличимых при заданных установках, создаются подбиблиотеки, в которых могут быть использованы другие методы предварительной обработки спектров и алгоритмы анализа. Количество спектров в библиотеке не ограничивается.

В библиотеку включают спектры веществ, соответствующих предъявляемым требованиям, качество которых подтверждено фармакопейными или другими аттестованными методами.

Для учета возможных вариаций свойств каждого вида анализируемых объектов регистрируют спектры нескольких серий (партий). Регистрацию спектров проводят в схожих условиях измерений и выполняют одинаковую предварительную обработку. Выбранная предварительная обработка включенных в библиотеку спектров сохраняется неизменной при последующих измерениях.

Методы предварительной обработки спектров. Рекомендуется проводить предварительную обработку спектров с целью повышения информативности получаемых результатов и уменьшения влияния спектральных вариаций. Обработка первичных данных может включать вычисление первой или второй производной, нормализацию, мультипликативную коррекцию рассеивания и другие методы или их комбинации. При выборе методов предварительной обработки спектров следует учитывать, что они могут привести к потере информации или появлению ошибок-артефактов.

Анализ данных. Сравнение спектров испытуемых образцов при качественном анализе проводится с индивидуальными или усредненными спектрами в библиотеке, в том числе с помощью различных математических методов.

Библиотека может использоваться для построения алгоритмов классификации. Возможно использование разных алгоритмов, например, метода главных компонент (МГК), комбинированного с кластерным анализом, метода SIMCA (soft independent modeling of class analogy – независимого моделирования аналогий классов), а также других алгоритмов, как включенных в математическое обеспечение БИК-спектрометров, так и разработанных третьей стороной. Надежность используемого метода должна быть проверена. Например, коэффициент корреляции, сумма квадратов

отклонений, расстояния внутри модели и прочие показатели должны быть согласованы с уровнем принятия решений, представленным в процедуре валидации.

Метод анализа должен быть валидирован.

Валидация метода качественного анализа. Валидация метода призвана продемонстрировать его пригодность для целей анализа.

Валидация метода проводится на проверочном наборе объектов, не участвовавших в построении метода, и предполагает проверку специфичности, чувствительности и устойчивости (робастности).

Чувствительность показывает, какая часть объектов проверочного набора, схожих с объектами библиотеки, правильно распознается как «свои».

Специфичность показывает, какая часть объектов проверочного набора, отличных от библиотечных, правильно распознается как «чужие».

Особое внимание уделяется результатам классификации объектов, спектры которых визуально схожи со спектрами объектов библиотеки, но отличаются от них по композиции или химической структуре. Такие образцы должны правильно определяться как «чужие».

Устойчивость показывает, что незначительные изменения условий (например, температура, влажность воздуха, вибрации, температура образца, степень уплотнения материала, глубина погружения зонда, толщина слоя и т.д.) не влияют на результаты и надежность идентификации или квалификации.

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ

Разработка калибровочной модели. При разработке модели устанавливается зависимость изменения интенсивности поглощения или отражения в спектре образцов от изменения свойств и/или состава веществ. При этом регистрируют спектры образцов с известными значениями их состава и/или их свойств, подтвержденных аттестованными методами. Так как хемометрические алгоритмы не допускают экстраполяций, необходимо, чтобы область калибровочных концентраций была не менее ожидаемого

диапазона анализируемых концентраций или других количественных характеристик. Калибровочные образцы должны быть по возможности равномерно распределены внутри диапазона рабочих концентраций.

Регистрацию спектров проводят при соблюдении параметров эксперимента, факторов, влияющих на результаты измерений и первичной обработки, которые предварительно оптимизированы для всех анализируемых объектов и сохраняются постоянными при последующих измерениях.

Калибровочную модель оптимизируют при помощи подходящего способа предварительной обработки спектров, выбора спектральной области и математического алгоритма.

Предварительная обработка спектров. Проводят так же, как описано в разделе «Качественный анализ».

Анализ данных. Для построения калибровочной модели может использоваться любой обоснованный математический алгоритм. Так как в области БИК диапазона наблюдается сильное перекрывание полос поглощения, количественный анализ проводят преимущественно хемометрическими алгоритмами, например такими, как метод проекций на латентные структуры (ПЛС, англ. PLS), метод регрессии на главные компоненты (РГК, англ. PCR) и другими.

Валидация калибровочной модели. Валидация модели калибровки предполагает демонстрацию ее пригодности для решения поставленной цели. При этом должны быть определены следующие валидационные характеристики: специфичность (селективность), линейность, рабочий диапазон концентраций (аналитическая область), правильность, прецизионность и устойчивость (робастность).

При построении калибровочных моделей с помощью хемометрических методов анализа качество калибровки оценивается по среднеквадратичному остатку калибровки (*RMSEC*) и среднеквадратичному остатку прогноза (*RMSEP*).

$$RMSEC = \sqrt{\frac{1}{N_c}\sum_{i=1}^{N_c}\left(\hat{y}_i - y_i\right)^2},$$

где N_c – число образцов калибровочного набора;

y_i – количественная характеристика, полученная по аттестованной методике;

$\hat{y}_i$ – количественная характеристика, полученная по калибровочной модели.

$$RMSEP = \sqrt{\frac{1}{N_p}\sum_{j=1}^{N_p}\left(\hat{y}_j - y_j\right)^2},$$

где N_p – число образцов проверочного набора, схожих с образцами калибровочного набора;

y_j – количественная характеристика, полученная по аттестованной методике;

$\hat{y}_j$ – предсказанная с помощью калибровочной модели количественная характеристика.

Для сравнения результатов калибровки, построенной по БИК-спектрам, с результатами, полученными по аттестованной методике, могут быть использованы альтернативные статистические методы (парный *t*-тест, оценка смещения и др.).

Выбросы

При анализе БИК методом следует учитывать, корректировать и обоснованно исключать резко выделяющиеся результаты.

Все выбросы подлежат анализу и, в случае их информативной важности или подтверждения правильности с помощью аттестованной методики, они могут быть включены в модель.

Ревалидация или повторная валидация

Прошедший валидацию и признанный пригодным для применения метод качественного или количественного анализа нуждается в периодической повторной валидации или ревалидации. При выявлении отклонений необходимо провести корректировку метода.

БИК метод повторно валидируют, если:

– в библиотеку добавлен новый объект (для качественного анализа);

– есть предпосылки к изменению характеристик объектов, спектры которых уже включены в библиотеку (изменение технологии производства (синтеза), состава, качества исходного сырья упаковки и т. д.);

– обнаружены иные изменения и/или несоответствия в свойствах анализируемых объектов или методике.

Перенос моделей

При переносе моделей качественного и количественного анализа с одного прибора на другой должны учитываться спектральные характеристики используемых спектрометров (разрешение, диапазон волновых чисел и др.). Под процедурами переноса моделей понимаются различные хемометрические алгоритмы (математические и статистические). После переноса на другой прибор для подтверждения работоспособности модели её необходимо ревалидировать.

Хранение данных

Хранение данных осуществляется в электронном виде в соответствии с требованиями программного обеспечения. При этом необходимо сохранять исходные спектры, не подвергшиеся математической обработке, с целью их возможного дальнейшего использования при оптимизации библиотек или методов.

Спектрометрия в инфракрасной области	**ОФС.1.2.1.1.0002.15** **Взамен ГФ X** **Взамен ст. ГФ XI, вып.1** **Взамен ГФ XII, ч.1, ОФС 42-0043-07**

Инфракрасные спектры (колебательные спектры) (ИК-спектры) возникают вследствие поглощения энергии электромагнитного излучения при колебаниях ядер атомов в молекулах или ионах, которые сопровождаются изменением дипольных моментов, и представляют собой зависимость пропускания или поглощения от длины волны (λ) или частоты колебаний (ν).

Под инфракрасной областью (ИК-область) подразумевают электромагнитное излучение в области длин волн от 0,78 до 400 мкм. Область от 780 до 2500 нм (от 0,78 до 2,5 мкм) рассматривается как ближняя ИК-область, область от 2,5 до 25 мкм (от 4000 до 400 $см^{-1}$) относится к средней ИК-области спектра и область от 25 до 400 мкм относится к дальней ИК-области. Наиболее часто используется средняя ИК-область.

Длину волны (λ) в ИК-спектрах обычно измеряют в микрометрах (микронах), мкм.

Поскольку частота колебаний в ИК-спектрах имеет большие числовые значения, обычно используют не частоты (ν), а волновые числа ($\bar{\nu}$), которые измеряются в $см^{-1}$ и связаны с частотой (ν) уравнением:

$$\bar{\nu} = \nu / c ,$$

где ν – частота, Гц ($с^{-1}$);
c – скорость света в вакууме, $см \cdot с^{-1}$.

Волновое число ($\bar{\nu}$) связано с длиной волны (λ, мкм) соотношением:

$$\bar{\nu} = 10^4/\lambda.$$

Приборы. Могут быть использованы инфракрасные спектрофотометры, снабженные оптической системой (призмы или дифракционные решетки), выделяющей монохроматическое излучение в измеряемой области, или спектрофотометры с Фурье-преобразованием. В последних используется полихроматическое излучение и рассчитывается спектр в заданной области частот путем Фурье-преобразования исходных данных. В таких приборах вместо диспергирующего прибора используется интерферометр, а обработка спектральных данных производится с помощью компьютера.

Подготовка образца. Для записи спектра пропускания или поглощения готовят образец субстанции по одной из следующих методик.

Жидкости. Жидкости исследуют в форме пленки между двумя пластинками, прозрачными для инфракрасного излучения, или в кювете с малой (обычно 0,01 – 0,05 мм) толщиной слоя, также прозрачной для инфракрасного излучения.

Жидкости или твердые вещества в растворе. Готовят раствор испытуемой субстанции в подходящем растворителе. Выбирают концентрацию вещества и толщину слоя кюветы, позволяющие получить удовлетворительный спектр.

Обычно хорошие результаты получают при концентрациях от 10 до 100 г/л при толщине слоя от 0,5 до 0,1 мм.

Поглощение растворителя компенсируют путем помещения в канал сравнения аналогичной кюветы, содержащей выбранный растворитель.

Кюветы. Если кюветы, заполненные растворителем, обладают разным поглощением при выбранной длине волны, то вносят поправку на измеренное поглощение испытуемого раствора. При использовании спектрофотометров с Фурье-преобразованием коррекция кювет не требуется, поскольку одна и та же кювета может быть использована и для растворителя и для испытуемого раствора. Кюветы для спектрометрии в инфракрасной

области изготавливают из солевых материалов (NaCl, KBr, CaF_2, LiF и др.). Область прозрачности кюветы в ИК-области зависит от использованного материала.

Растворители. Не существует растворителей, которые при значительной толщине слоя были бы полностью прозрачными для ИК-спектров. Четыреххлористый углерод (при толщине слоя до 5 мм) практически прозрачен до 6 мкм (1666 $см^{-1}$). Углерода дисульфид (толщиной 1 мм) подходит как растворитель до 40 мкм (250 $см^{-1}$) за исключением областей от 4,2 до 5,0 мкм (от 2381 до 2000 $см^{-1}$) и от 5,5 до 7,5 мкм (от 1819 до 1333 $см^{-1}$), где он имеет сильное поглощение. Другие растворители прозрачны в относительно узкой области. Растворители, применяемые в спектрометрии в инфракрасной области, должны быть инертны к материалу, из которого сделана кювета.

Твердые вещества. Твердые вещества исследуют в твердом состоянии (диски из галогенидов щелочных металлов), диспергированными в подходящей жидкости в виде суспензии или формируют пленку из расплавленной массы между двумя пластинами, прозрачными для инфракрасного излучения. Подготовку образца описывают в фармакопейной статье.

Диски. 1 – 3 мг вещества, предназначенного для испытания, растирают с 150 – 200 мг (если не указано иначе в фармакопейной статье) тщательно измельченного и высушенного калия бромида или калия хлорида (обычно используют калия бромид). Типичные условия высушивания калия бромида: при 105 °С в вакууме, в течение 12 ч. Обычно такого количества достаточно для приготовления диска диаметром 13 мм и получения спектра подходящей интенсивности. Смесь тщательно перетирают, добиваясь необходимой однородности, и прессуют диск при давлении около 800 МПа (8 $т/см^2$) в вакууме (2 – 3 мм рт. ст.) в течение 2 – 5 мин. Причиной образования некачественных дисков могут быть такие факторы, как недостаточное или чрезмерное растирание, влага или иные примеси в дисперсионной среде.

Диск не пригоден для испытания, если в области прохождения луча на диске имеются трещины, или при визуальном осмотре он неоднороден по прозрачности, или его пропускание при 2000 $см^{-1}$ (5 мкм) составляет менее 60 % без компенсации при отсутствии специфической полосы поглощения.

Суспензии. Небольшое количество вещества, предназначенного для испытания, растирают с минимальным количеством вазелинового масла или другой подходящей жидкости (смешивают 5 – 20 мг твердого вещества с 1 – 2 каплями иммерсионной жидкости). Полученную суспензию сжимают между двумя пластинками (NaCl или KBr), прозрачными для инфракрасного излучения.

Газы. Газы исследуют в кювете, прозрачной для инфракрасного излучения, с длиной оптического пути около 100 мм. Откачивают воздух из кюветы и заполняют анализируемым газом через кран или при помощи игольчатого клапана.

Если необходимо, доводят давление в кювете до атмосферного, используя газ, прозрачный для инфракрасного излучения (например, азот или аргон). Для исключения помех, связанных с поглощением воды, углерода диоксида или других атмосферных газов, в канал сравнения помещают идентичную кювету, которая либо вакуумирована, либо заполнена газом, прозрачным для инфракрасного излучения.

Для записи спектра по ***методу нарушенного полного внутреннего отражения*** подготовку образца проводят одним из способов.

Растворы. Вещество растворяют в соответствующем растворителе, соблюдая условия, приведенные в фармакопейной статье. Раствор испаряют на поверхности внутреннего элемента отражения, который обычно изготавливают из кристалла бромида йодида таллия (KRS-5), германия или другого минерала с большим показателем преломления.

Твердые вещества. Вещество помещают на поверхность внутреннего элемента отражения таким образом, чтобы достичь как можно более плотного и полного контакта со всей поверхностью кристалла (обычно

подготовку таких образцов проводят под давлением).

Подготовка образцов для ***спектрометрии в инфракрасной области диффузного отражения***: испытуемое вещество растирают с тщательно измельченным и высушенным калия бромидом или калия хлоридом. Если не указано иначе в фармакопейной статье, содержание испытуемого вещества в полученной смеси должно составлять около 5 %. Смесь тщательно перетирают и регистрируют спектр.

Идентификация с использованием стандартных образцов

Образец испытуемого вещества и стандартный образец готовят по одной и той же методике и записывают спектры, если не указано иначе в фармакопейной статье, в области от 4000 до 650 $см^{-1}$, в некоторых случаях до 200 $см^{-1}$, в одних и тех же условиях. Полосы поглощения в спектре испытуемого образца должны соответствовать по положению полосам поглощения в спектре стандартного образца. Под полосами поглощения подразумевают минимумы пропускания и максимумы поглощения.

Если спектры, полученные в твердом состоянии, показывают различия в положении полос поглощения, то испытуемую субстанцию и стандартный образец обрабатывают одним и тем же способом так, чтобы они кристаллизовались или получались в одной и той же форме, или обрабатывают способом, указанным в фармакопейной статье, а затем снимают спектры.

Идентификация с использованием эталонных спектров

Контроль разрешающей способности. Записывают спектр пленки полистирола толщиной 0,04 мм. Разность x (рисунок) между процентом пропускания при максимуме пропускания A при 2870 $см^{-1}$ (3,48 мкм) и минимуме пропускания B при 2849,5 $см^{-1}$ (3,51 мкм) должна быть больше 18. Разность y между процентом пропускания при максимуме пропускания C при 1589 $см^{-1}$ (6,29 мкм) и минимуме пропускания D при 1583 $см^{-1}$ (6,32 мкм) должна быть больше 10.

Контроль разрешающей способности ИК-спектрометров с Фурье-

преобразованием проводят в соответствии с рекомендациями производителя прибора.

Проверка шкалы волновых чисел. Шкала волновых чисел может быть проверена с помощью пленки полистирола, которая имеет минимум пропускания (максимум поглощения) при волновых числах (в $см^{-1}$), приведенных в таблице.

Методика. Субстанцию готовят к испытанию в соответствии с инструкцией, прилагаемой к эталонному спектру. Используя условия, при которых проводилась проверка разрешающей способности, записывают спектр испытуемого образца и на него накладывают полосы полистирола при 2849,5 $см^{-1}$ (3,51 мкм), 1601,2 $см^{-1}$ (6,25 мкм) и 1028,3 $см^{-1}$ (9,72 мкм). Сравнивают два спектра (эталонный и спектр испытуемой субстанции) и полосы полистирола, указанные выше. При использовании положения полос полистирола в качестве стандартных величин, положения значимых полос в спектре испытуемой субстанции и в эталонном спектре должны соответствовать друг другу в пределах 0,5 % от шкалы волновых чисел. Относительная величина полос обоих спектров должна согласовываться между собой.

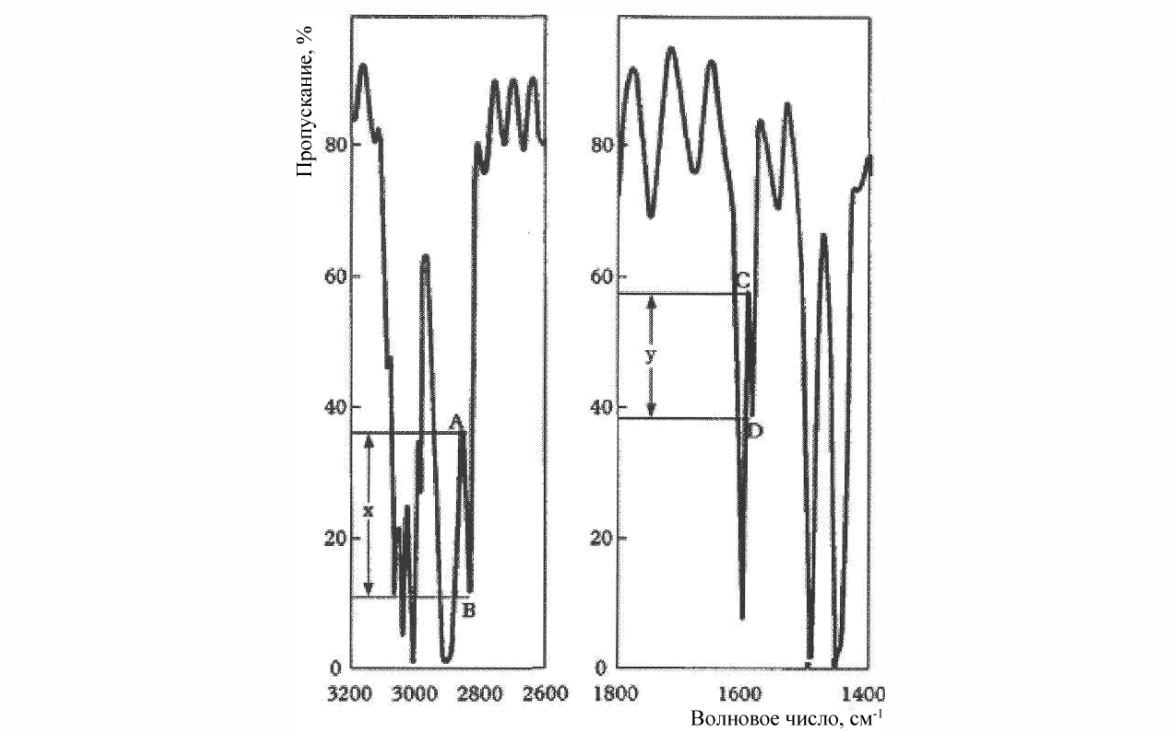


Рисунок – Типичный спектр полистирола, используемый для проверки

разрешающей способности

Таблица 1 – Минимумы пропускания и допустимые пределы для пленки полистирола

Минимумы пропускания, $см^{-1}$	**Допустимые пределы, $см^{-1}$**	
	ИК-спектрометр с монохроматором	**ИК-спектрометр с Фурье-преобразованием**
3060,0	± 1,5	± 1,0
2849,5	± 1,5	± 1,0
1942,9	± 1,5	± 1,0
1601,2	± 1,0	± 1,0
1583,0	± 1,0	± 1,0
1154,5	± 1,0	± 1,0
1028,3	± 1,0	± 1,0

Примеси в газах

Для анализа примесей в газах используют кювету, прозрачную для инфракрасного излучения и имеющую соответствующую длину оптического пути. Кювету заполняют так, как указано в разделе «Газы». Для обнаружения и количественной оценки примесей используют методики, указанные в фармакопейных статьях.

Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях	**ОФС.1.2.1.1.0003.15** **Взамен ст. ГФ X** **Взамен ст. ГФ XI, вып.1** **Взамен ГФ XII, ч.1,** **ОФС 42-0042-07**

Спектроскопические методы анализа основаны на избирательном поглощении электромагнитного излучения анализируемым веществом и служат для исследования строения, идентификации и количественного определения светопоглощающих соединений.

В зависимости от используемой аппаратуры в фармацевтическом анализе различают следующие методы анализа, основанные на поглощении электромагнитного излучения и испускании света:

- спектрофотометрия в ультрафиолетовой (УФ) и видимой областях;
- спектрометрия в инфракрасной (ИК) области;
- атомно-эмиссионная спектрометрия (АЭС);
- атомно-абсорбционная спектроскопия (ААС);
- флуориметрия;
- спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР);
- масс-спектрометрия;
- рамановская спектрометрия;
- рентгеновская флуоресцентная спектрометрия;
- рентгеновская порошковая дифрактометрия.

Ряд длин волн, для которых проводятся измерения методами абсорбционной спектрофотометрии, охватывает спектральную область от коротких длин волн в УФ-области до ИК-области. Для удобства отнесений

этот спектральный ряд делится на следующие диапазоны длин волн: УФ (от 190 до 380 нм), видимый (от 380 до 780 нм), ИК (от 0,78 до 400 мкм).

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЯ В УЛЬТРАФИОЛЕТОВОЙ И ВИДИМОЙ ОБЛАСТЯХ

Уменьшение интенсивности монохроматического излучения, проходящего через гомогенную поглощающую среду, количественно описывается законом Бугера-Ламберта-Бера:

$$log_{10}(1/T) = A = \varepsilon \cdot c \cdot b\,, \qquad (1)$$

где T – пропускание, отношение интенсивности светового потока, прошедшего через вещество, к интенсивности падающего на вещество светового потока: $T = I/I_0$;
I – интенсивность прошедшего монохроматического излучения;
I_0 – интенсивность падающего монохроматического излучения;
ε – молярный показатель поглощения;
c – молярная концентрация вещества в растворе;
b – длина оптического пути или толщина слоя, см.

Величина $log_{10}(1/T)$ носит название оптической плотности, обозначается буквой A и является измеряемой величиной. В отсутствие других физико-химических факторов измеренная оптическая плотность (A) пропорциональна концентрации вещества в растворе (c) и толщине слоя (b).

Величина $A_{1см}^{1\%}$ представляет собой удельный показатель поглощения, т.е. оптическую плотность раствора вещества с концентрацией 10 г/л (1 г/100 мл) в кювете с толщиной слоя 1 см. Величины $A_{1см}^{1\%}$ и ε связаны соотношением:

$$A_{1см}^{1\%} = \frac{10 \cdot \varepsilon}{М.м.}, \qquad (2)$$

где М.м. – молекулярная масса исследуемого вещества.

Измерение оптической плотности. Если нет других указаний в фармакопейной статье, измерение оптической плотности проводят при указанной длине волны с использованием кювет с толщиной слоя 1 см и при температуре (20 ± 1) °С по сравнению с тем же растворителем или той же смесью растворителей, в которой растворено вещество. При измерении

оптической плотности раствора при данной длине волны оптическая плотность кюветы с растворителем, измеренная против воздуха при той же длине волны, не должна превышать 0,9 и, желательно, чтобы она была не менее 0,2.

Спектр поглощения представляют таким образом, чтобы оптическая плотность или ее некоторая функция были приведены по оси ординат, а длина волны или некоторая функция длины волны – по оси абсцисс.

Если в фармакопейной статье для максимума поглощения указывается только одна длина волны, то это означает, что полученное значение максимума не должно отличаться от указанного более чем на ± 2 нм.

Приборы. Спектрофотометры, предназначенные для измерений в ультрафиолетовой (УФ) и видимой областях спектра, состоят из оптической системы, выделяющей монохроматическое излучение в области от 190 до 800 нм и обеспечивающей его прохождение через образец, и устройства для измерения оптической плотности.

Основными частями этих приборов являются: источник излучения, диспергирующий прибор (призма или решетка), щель для выделения полосы длин волн, кюветы для образцов, детектор излучаемой энергии, встроенные усилители и измерительные приборы.

Проверка шкалы длин волн в УФ и видимой области. Точность калибровки прибора по шкале длин волн в спектральном ряду проверяют по приведенным в табл. 1 спектральным линиям водородной (Hβ) или дейтериевой (Dβ) разрядной лампы, линиям паров ртути (Hg) кварцево-ртутной дуговой лампы, а также по максимумам поглощения раствора гольмия перхлората (Ho) (готовый реактив для калибровки спектрофотометра представляет собой 4 % раствор гольмия оксида в 14,1 % растворе хлорной кислоты). Допустимое отклонение составляет ± 1 нм для УФ и ± 3 нм для видимой области.

Таблица 1 – Максимумы поглощения для проверки шкалы длин волн

241,15 нм (Ho)	404,66 нм (Hg)
253,70 нм (Hg)	435,83 нм (Hg)
287,15 нм (Ho)	486,00 нм (Dβ)
302,25 нм (Hg)	486,10 нм (Hβ)
313,16 нм (Hg)	536,30 нм (Ho)
334,15 нм (Hg)	546,07 нм (Hg)
361,50 нм (Ho)	576,96 нм (Hg)
365,48 нм (Hg)	579,07 нм (Hg)

Шкала длин волн может быть калиброва также при помощи подходящих стеклянных фильтров, которые имеют фиксированные полосы поглощения в видимой и УФ областях, а также стандартных стекол, содержащих дидим (смесь празеодима и неодима), и стекол, содержащих гольмий.

Проверка шкалы оптической плотности. Для проверки шкалы оптической плотности используют стандартные неорганические стеклянные фильтры или раствор калия дихромата при длинах волн, указанных в табл. 2, где для каждой длины волны приведено точное значение удельного показателя поглощения $A_{1см}^{1\%}$ и допустимые пределы.

Раствор калия дихромата для проверки шкалы оптической плотности при 235, 257, 313 и 350 нм готовят следующим образом: от 57,0 до 63,0 мг (точная навеска) калия дихромата, предварительно высушенного до постоянной массы при температуре 130 °С, растворяют в 0,005 М растворе серной кислоты и доводят объем раствора тем же растворителем до 1000 мл. Для проверки оптической плотности при 430 нм растворяют 57,0 – 63,0 мг (точная навеска) калия дихромата в 0,005 М растворе серной кислоты и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

Таблица 2 – Удельный показатель поглощения стандартов при различных длинах волн

Длина волны, нм	Удельный показатель поглощения $A_{1см}^{1\%}$	Допустимые пределы для $A_{1см}^{1\%}$
235	124,5	от 122,9 до 126,2
257	144,5	от 142,8 до 146,2
313	48,6	от 47,0 до 50,3
350	107,3	от 105,6 до 109,0
430	15,9	от 15,7 до 16,1

Предельный уровень рассеянного света. Рассеянный свет может быть обнаружен при данной длине волны с использованием соответствующих фильтров или растворов. Например, оптическая плотность раствора 12 г/л калия хлорида в кювете с толщиной слоя 1 см резко увеличивается между 220 и 200 нм и должна быть больше 2 при 198 нм при использовании воды в качестве раствора сравнения.

Разрешающая способность (для качественного анализа). Если есть указание в фармакопейной статье, определяют разрешающую способность спектрофотометра следующим образом. Записывают спектр 0,02 % (о/о) раствора толуола в гексане. Минимально допустимое значение отношения оптической плотности в максимуме поглощения при 269 нм к оптической плотности в минимуме поглощения при 266 нм указывают в фармакопейной статье.

Ширина спектральной щели (для количественного анализа). В случае использования спектрофотометра с изменяемой шириной спектральной щели при выбранной длине волны возможны погрешности, связанные с шириной этой щели. Для их исключения ширина щели должна быть малой по сравнению с полушириной полосы поглощения (шириной на половине оптической плотности) и в то же время должна быть максимально велика для получения высокого значения интенсивности падающего монохроматического излучения (I_0). Таким образом, ширина щели должна

быть такой, чтобы дальнейшее ее уменьшение не изменяло величину измеряемой оптической плотности.

Кюветы. Допустимые отклонения в толщине слоя используемых кювет должны быть не более ± 0,005 см. Кюветы, предназначенные для испытуемого раствора и раствора сравнения, должны иметь одинаковое пропускание (или оптическую плотность) при заполнении одним и тем же растворителем. В противном случае это различие следует учитывать.

Требования к растворителям. Для определений, производимых в УФ и видимой областях, образец анализируемого вещества растворяют в соответствующем растворителе, который должен быть оптически прозрачным в используемой области длин волн. Для этих областей длин волн пригодны многие растворители, в том числе вода, спирты, хлороформ, низшие углеводороды, эфиры и разбавленные растворы сильных кислот и щелочей.

Идентификация

Абсорбционную спектрофотометрию в УФ и видимой областях спектра применяют для определения подлинности лекарственных средств путем:

– сравнения спектров поглощения испытуемого раствора и раствора стандартного образца; в указанной области спектра должно наблюдаться совпадение положений максимумов, минимумов, плеч и точек перегиба;

– указания положений максимумов, минимумов, плеч и точек перегиба спектра поглощения испытуемого раствора; расхождение между наблюдаемыми и указанными длинами волн в максимумах и минимумах поглощения не должно обычно превышать ± 2 нм.

Возможны и другие варианты применения, оговоренные в фармакопейных статьях.

Количественное определение

Определение концентрации веществ спектрофотометрическим методом основано на использовании закона Бугера-Ламберта-Бера:

$$C = \frac{A}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot b}, \qquad (3)$$

где C – концентрация вещества, г/100 мл;
A – оптическая плотность испытуемого раствора;
$A_{1см}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения вещества;
b – длина оптического пути или толщина слоя, см.

В ряде случаев даже при использовании монохроматического излучения могут наблюдаться отклонения от закона Бугера-Ламберта-Бера, обусловленные процессами диссоциации, ассоциации и комплексообразования. Поэтому предварительно следует проверить линейность зависимости оптической плотности раствора от концентрации в аналитической области. При наличии отклонений от линейной зависимости следует пользоваться не формулой (3), а экспериментально найденной зависимостью.

Обычно определение концентрации спектрофотометрическим методом проводят с использованием стандартного образца. Расчет концентрации основан на использовании уравнения:

$$\frac{C}{C_0} = \frac{A}{A_0} \quad , \qquad (4)$$

где C и C_0 – концентрации испытуемого раствора и раствора стандартного образца соответственно;
A и A_0 – оптические плотности испытуемого раствора и раствора стандартного образца соответственно.

Концентрации испытуемого и раствора стандартного образца должны быть близки.

Вначале измеряют оптическую плотность раствора стандартного образца, приготовленного, как указано в фармакопейной статье, затем проводят измерение оптической плотности испытуемого раствора. Второе измерение проводят сразу после первого с использованием той же кюветы, в тех же экспериментальных условиях.

Метод с использованием раствора стандартного образца является более точным и надежным. Возможность применения значения удельного

показателя поглощения в каждом конкретном случае следует обосновывать. Обычно метод с использованием значения удельного показателя поглощения применим при допусках содержания анализируемого вещества не менее ± 10 % от номинального содержания.

Многокомпонентный спектрофотометрический анализ

Многокомпонентный спектрофотометрический анализ (анализ смесей) применяют для одновременного количественного определения нескольких компонентов лекарственных средств, каждое из которых подчиняется закону Бугера-Ламберта-Бера.

Количественное определение в многокомпонентном спектрофотометрическом анализе основывается обычно на использовании уравнения:

$$A_i = \sum_{j=1}^{m} E_{ij} \cdot c_j , \qquad i = 1, \dots n, \qquad (5)$$

где A_i – оптическая плотность испытуемого раствора при *i*-ой длине волны;
E_{ij} – показатели поглощения (зависящие от способа выражения концентрации) *j*-го компонента образца при *i*-ой аналитической длине волны;
c_j – концентрация *j*-го компонента образца.

Соответствующие методики проведения анализа и расчетные формулы указываются в фармакопейных статьях.

Производная спектрофотометрия

В производной спектрофотометрии исходные спектры поглощения (нулевого порядка) преобразуются в спектры производных первого, второго и более высокого порядков.

Спектр первой производной представляет собой график зависимости градиента кривой поглощения (скорость изменения оптической плотности от длины волны, $dA/d\lambda$) от длины волны.

Спектр второй производной представляет собой график зависимости кривизны спектра поглощения ($d^2A/d\lambda^2$) от длины волны. Вторая производная при любой длине волны связана с концентрацией следующим соотношением:

$$\frac{d^2A}{d\lambda^2} = \frac{d^2A_{1см}^{1\%}}{d\lambda^2} \cdot c \cdot l\,, \quad (6)$$

где A – оптическая плотность при длине волны λ;
$A_{1см}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения при длине волны λ;
c – концентрация вещества в растворе, г/100 мл;
l – толщина слоя, см.

Производная спектрофотометрия может быть использована как для целей идентификации веществ, так и для их количественного определения в многокомпонентных смесях, а также в тех случаях, когда имеется фоновое поглощение, вызванное присутствием веществ, содержание которых не регламентируется.

Приборы. Используют спектрофотометры, отвечающие указанным выше требованиям и оснащенные аналоговым резистивно-емкостным дифференцирующим модулем или цифровым дифференциатором, или другими средствами получения производных спектров, в соответствии с инструкцией к прибору. Некоторые методы получения спектров второй производной приводят к смещению длин волн относительно исходного спектра, что следует учитывать там, где это необходимо.

Разрешающая способность. Если указано в фармакопейных статьях, записывают спектр второй производной для раствора 0,2 г/л толуола в метаноле, используя метанол в качестве раствора сравнения. На спектре должен присутствовать небольшой отрицательный экстремум, расположенный между двумя большими отрицательными экстремумами при 261 и 268 нм, в соответствии с рисунком. Если нет других указаний в фармакопейных статьях, отношение A/B должно быть не менее 0,2.

Методика. Процедура анализа аналогична применяемой в обычной спектрофотометрии, но вместо оптических плотностей используют производные. Готовят раствор испытуемого образца, настраивают прибор в соответствии с инструкцией производителя и рассчитывают количество определяемого вещества, как указано в фармакопейной статье.

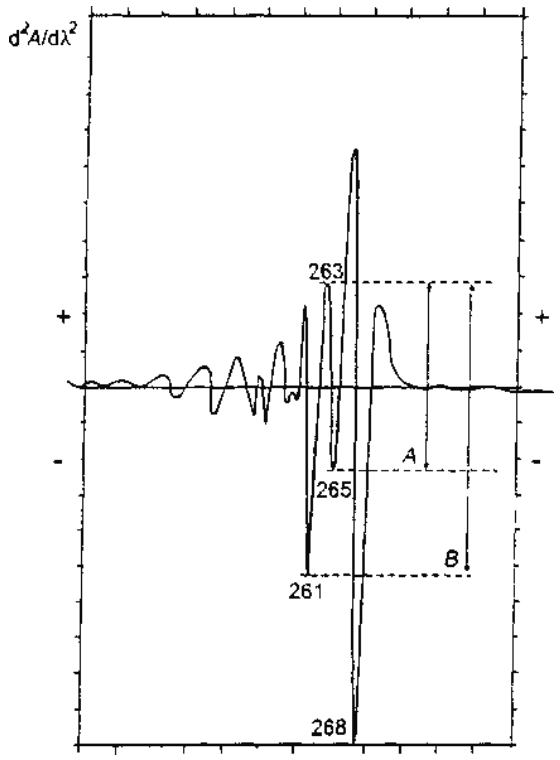


Рисунок – Спектр второй производной раствора толуола (0,2 г/л) в метаноле

Атомно-эмиссионная спектрометрия	**ОФС.1.2.1.1.0004.15** **Взамен ст. ГФ XI, вып.1** **Взамен ст. ГФ XII, ч.1, ОФС 42-0044-07**

Атомно-эмиссионная спектрометрия – совокупность методов, основанных на измерении электромагнитного излучения, испускаемого термически возбужденными атомами или одноатомными ионами.

Общие принципы. При применении метода атомно-эмиссионной спектрометрии образец подвергается воздействию высоких температур, вызывающих процессы испарения вещества, диссоциации молекул на атомы, ионизации и возбуждения атомов. Эти процессы являются равновесными и зависимыми от температуры. При термическом возбуждении атома или иона валентные электроны переходят с основного уровня на уровни с более высокой энергией. При обратном переходе валентного электрона на нижний энергетический уровень происходит испускание электромагнитного излучения (эмиссия) определенной длины волны (λ) в соответствии с соотношением:

$$\Delta E = hc/\lambda,$$

где ΔE – разница в энергиях двух энергетических уровней, Дж;

h – постоянная Планка ($6{,}626 \cdot 10^{-34}$ Дж · с);

c – скорость света (299 792 458 м/с).

Зависимость интенсивности испускаемого электромагнитного излучения от длины волны называется *эмиссионным спектром*. Число линий в эмиссионном

спектре элемента определяется числом валентных электронов и числом разрешенных межуровневых переходов. Спектры атомов с малым числом валентных электронов (щелочные, щелочно-земельные металлы) имеют мало линий. Атомы со сложно построенными внешними оболочками (особенно элементы побочных подгрупп периодической системы) дают спектры с большим числом линий. Линии, соответствующие переходам на основной энергетический уровень, называют резонансными. В эмиссионном спектре резонансные линии наблюдаются в видимой и УФ областях. Интенсивность (I) линии эмиссионного спектра элемента прямо пропорциональна числу возбужденных атомов или однозарядных ионов (N^*). Возбужденные и невозбужденные атомы и однозарядные ионы находятся между собой в термодинамическом равновесии, положение которого описывается законом распределения Больцмана:

$$N^*/N_0 = (g^*/g_0)\, e^{-E/kT},$$

где N_0 – число невозбужденных атомов или однозарядных ионов;

g^* и g_0 – статистический вес возбужденного и невозбужденного состояния;

E – энергия возбуждения, Дж;

k – постоянная Больцмана, ($1{,}381 \cdot 10^{-23}$ Дж/К);

T – абсолютная температура, К.

При постоянной температуре интенсивность спектральной линии элемента прямо пропорциональна числу невозбужденных атомов элемента, которое при заданных условиях атомизации пропорционально концентрации определяемого элемента в пробе (C). Поэтому между интенсивностью спектральной линии элемента в эмиссионном спектре и концентрацией определяемого элемента существует прямо пропорциональная зависимость:

$$I = k \cdot C,$$

где I – интенсивность спектральной линии элемента;

k – коэффициент пропорциональности;

C – концентрация определяемого элемента в растворе, %.

Коэффициент k является эмпирической величиной, зависящей от источника атомизации и возбуждения (атомизатора). Основной характеристикой любого атомизатора является его температура. Температура определяет совокупность равновесий процессов, протекающих в атомизаторе, и, как следствие, интенсивность спектральных линий и метрологические характеристики методики. Равновесие процессов испарения и диссоциации молекул на атомы подвержено влиянию конкурирующих химических реакций (например, образование под действием анионов труднолетучих и малодиссоциирующих соединений – фосфатов, силикатов, боратов, образование оксидов и карбидов металлов и т.д.). Мешающее влияние анионов становится заметным при понижении температуры. Присутствие легко ионизируемых катионов смещает равновесие процессов возбуждения и ионизации в сторону образования возбужденных атомов. Помехи от присутствия катионов возрастают с повышением температуры. Изменение интенсивности определяемого элемента под влиянием других присутствующих в пробе элементов называют эффектом матрицы. Эффект матрицы устраняют добавлением в испытуемый образец химических модификаторов или ионизационных буферов.

Основные типы атомизаторов и их температурные и метрологические характеристики приведены в табл. 1.

Таблица 1 – Температурные и метрологические характеристики различных типов атомизаторов

Атомизатор	t, ^{0}C	Состояние пробы	C_{min}, масс.%	Относительное стандартное отклонение (S_r)
Пламя	1500 – 3000	Раствор	$10^{-7} – 10^{-2}$	0,01 – 0,05
Электрическая дуга	3000 – 7000	Твердая	$10^{-4} – 10^{-2}$	0,1 – 0,2
Электрическая искра	10000 – 12000	Твердая	$10^{-3} – 10^{-1}$	0,05 – 0,10

Индуктивно связанная плазма	6000 – 10000	Раствор	$10^{-8} – 10^{-2}$	0,01 – 0,05

Пламя – самый низкотемпературный атомизатор, используемый в атомно-эмиссионной спектрометрии. Достигаемые в пламени температуры оптимальны для определения наиболее легко атомизируемых и возбудимых элементов – щелочных и щелочноземельных металлов. Для них чувствительность метода пламенной атомно-эмиссионной спектрометрии составляет 10^{-7} масс.%. Для большинства других элементов нижние пределы определения на несколько порядков выше. Важное достоинство пламени, как источника возбуждения, – высокая стабильность и связанная с ней хорошая воспроизводимость результатов измерений [среднее стандартное отклонение S_r 0,01 – 0,05]. Для образования пламени готовят газовую смесь, состоящую из горючего газа и газа-окислителя. Выбор компонентов той или иной газовой смеси определяется требуемой температурой пламени, которая зависит от энергии возбуждения определяемого элемента. Табл. 2 содержит информацию о наиболее часто используемых видах пламени.

Таблица 2 – Температура наиболее часто используемых газовых смесей

Горючий газ	Окисли-тель	t, ^{0}C	Скорость горения, см/с	Характер пламени	Возбуждаемые элементы
метан	воздух	1800	55	ламинарный	щелочные металлы
ацетилен	воздух	2200	266	ламинарный	щелочные и щелочнозе-мельные металлы
водород	кислород	2800	3680	турбулентный	щелочные, щелочнозе-мельные, тяжелые металлы

ацетилен	кислород	3100	2480	турбулентный	Ag, Cu, Mn и др.
ацетилен	закись азота	3200	120	ламинарный	тяжелые металлы

Многие металлы в пламени имеют тенденцию образовывать тугоплавкие, устойчивые к диссоциации оксиды. Для повышения степени образования свободных атомов создают восстановительную атмосферу пламени путем повышения скорости потока горючего газа. Такое пламя называют обогащённым. Главное ограничение применения пламенного атомизатора – недостаточная способность вызывать эмиссию у многих элементов, необходимую для их определения.

Электрическая дуга. В атомно-эмиссионной спектрометрии в качестве источников возбуждения атомов исследуемого вещества используют дуговые разряды постоянного и переменного тока. Между парой электродов (как правило, угольных) пропускают электрический разряд. При этом в углубление одного из электродов помещают пробу в твердом состоянии. Температура дугового разряда составляет 3000 – 7000 ºС. Таких температур достаточно для атомизации и возбуждения большинства элементов, кроме наиболее трудновозбудимых неметаллов – галогенов. Поэтому для большого числа элементов пределы обнаружения в дуговом разряде ниже, чем в пламени (табл. 1). Дуговые атомизаторы, в отличие от пламенных, не обладают высокой стабильностью работы, поэтому воспроизводимость результатов невелика (S_r 0,1 ÷ 0,2).

Электрическая искра. Искровой атомизатор устроен так же, как и дуговой и предназначен в первую очередь для анализа твёрдых образцов на качественном уровне.

Индуктивно связанная плазма – современный атомизатор, обладающий необходимыми аналитическими возможностями и метрологическими характеристиками. Атомизатор с индуктивно связанной плазмой представляет

собой горелку с аргоновой плазмой, которая инициируется искровым зарядом и стабилизируется высокочастотной индукционной катушкой. Температура аргоновой плазмы изменяется по высоте горелки и составляет 6000 – 10000 ºС. При столь высоких температурах возбуждается большинство элементов. Чувствительность метода составляет 10^{-8} – 10^{-2} масс. % в зависимости от элемента. Воспроизводимость характеристик аргоновой горелки высока, что позволяет в широком концентрационном диапазоне проводить количественный анализ с воспроизводимостью S_r 0,01 ÷ 0,05.

Методы атомно-эмиссионной спектрометрии предназначены для обнаружения и количественного определения элементов. Качественный анализ проводится по положению линий в спектре. Для количественного анализа достоверной мерой концентрации определяемого элемента является интенсивность линии.

Прибор. Основные составляющие атомно-эмиссионного спектрометра:

- система ввода образца и система распыления;
- атомизатор (пламенная горелка в пламенной атомно-эмиссионной спектрометрии; высокочастотный генератор и плазменная горелка в атомно-эмиссионной спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой);
- дисперсионное устройство, состоящее из дифракционных решеток, призм, фильтров или интерферометров;
- детектор, преобразующий энергию излучения в электрическую;
- устройство сбора данных.

Эксплуатацию прибора осуществляют в строгом соответствии с инструкциями производителя. Следует проверять надлежащее функционирование атомно-эмиссионного спектрометра. Для проверки выполняют соответствующие испытания, включающие, как правило, проверку эффективности и стабильности распылителя; измерение разрешения оптической

системы путем измерения ширины пика на уровне половины его высоты; расчет пределов обнаружения элементов в выбранном диапазоне длин волн.

Методика. Пробоподготовка зависит от типа атомизатора. В случае пламенной спектрометрии и атомно-эмиссионной спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой приготовление проб заключается в растворении испытуемого образца и обеспечении концентрации испытуемого раствора, соответствующей рабочему диапазону прибора. В качестве растворителя рекомендуется использовать воду. Используемая вода должна быть деионизованной на ионообменных смолах и соответствовать требованиям, предъявляемым к воде очищенной. Некоторые системы ввода проб допускают использование высоких концентраций кислот при подтверждении отсутствия влияния растворителя на стабильность пламени, в определённых случаях могут использоваться органические растворители. При применении органических растворителей следует учитывать необходимость введения кислорода для предупреждения образования органических слоев. Для устранения эффектов матрицы готовят контрольный раствор и добавляют, в случае необходимости, в испытуемый раствор химический модификатор или ионизационный буфер. При проведении количественных измерений готовят растворы сравнения – стандартные растворы определяемого элемента известной концентрации. Если в фармакопейной статье не указано иное, все реагенты, используемые при приготовлении испытуемого раствора, прибавляют к стандартным растворам определяемого элемента и контрольному раствору в таких же концентрациях. Испытуемый, контрольный и стандартные растворы готовят, как указано в фармакопейной статье. Для приготовления растворов рекомендуется использовать пластиковую лабораторную посуду. При использовании техники ввода твердых проб условия проведения анализа должны быть указаны в фармакопейной статье.

Атомно-эмиссионный спектрометр выводят на рабочий режим в

соответствии с инструкцией производителя и устанавливают рабочие параметры эксплуатации прибора, указанные в фармакопейной статье (скорость подачи образца в атомизатор, длину волны, положение обзора эмиссии – радиальное или аксиальное, время интегрирования – время для измерения интенсивности эмиссии на каждой длине волны; число повторов измерения эмиссии и т.д.). В атомизатор вводят контрольный раствор и устанавливают регистрирующее устройство на нулевое значение. Контрольный, испытуемый и стандартные растворы вводят в прибор в одинаковом количестве повторов. При количественных измерениях число повторов должно быть не менее 5. Относительное стандартное отклонение величин полученных откликов не должно превышать 1 %. После каждого измерения прибор промывают и проверяют, чтобы показание прибора возвращалось к первоначальному значению, полученному при измерении контрольного раствора. Измерение содержания определяемого элемента проводят путем сравнения эмиссии испытуемого раствора с эмиссией стандартных растворов известной концентрации с использованием метода калибровочной кривой или метода стандартных добавок.

Метод калибровочной кривой. Готовят не менее трех стандартных растворов определяемого элемента так, чтобы диапазон концентраций этих растворов включал ожидаемое значение концентраций определяемого элемента в испытуемом растворе. Вводят стандартные растворы определяемого элемента и строят калибровочную кривую зависимости средних значений эмиссий стандартных растворов от концентрации определяемого элемента. Калибровочную кривую рассчитывают методом регрессии наименьших квадратов по всем измеренным данным калибровочного испытания. По графику определяют концентрацию определяемого элемента в испытуемом растворе.

Метод стандартных добавок. Равные объемы испытуемого раствора помещают не менее чем в три мерные колбы одинаковой вместимости. Во все колбы, кроме одной, прибавляют пропорционально увеличивающиеся объемы

стандартного раствора с известной концентрацией определяемого элемента (стандартные добавки), доводят содержимое каждой колбы используемым растворителем до метки, перемешивают. Значение эмиссии растворов со стандартными добавками (растворов сравнения) должно находиться в линейной области калибровочной кривой. Методом наименьших квадратов рассчитывают параметры линейного уравнения зависимости среднего значения результата измерения эмиссии от концентрации раствора и вычисляют концентрацию определяемого элемента в испытуемом растворе. Расчет концентрации может быть произведен графическим методом. Для этого строят график зависимости среднего результата измерения эмиссии от добавленного количества определяемого элемента. Экстраполируют линию, соединяющую эти точки на графике, до пересечения с осью абсцисс. Расстояние от начала координат до полученной точки пересечения дает концентрацию определяемого элемента в испытуемом растворе.

Атомно-абсорбционная спектрометрия	**ОФС.1.2.1.1.0005.18** **Взамен ГФ XII** **ОФС 42-0044-07**

Атомная абсорбционная спектрометрия применяется для определения содержания химических элементов в испытуемом образце путем измерения величины поглощения (абсорбции) излучения при определенной длине волны, соответствующей определяемому элементу, атомным паром элемента, генерированным из вещества, например, при введении раствора вещества в пламя.

Относительная погрешность метода атомно-абсорбционной спектрометрии, в зависимости от концентрации вещества, обычно составляет до 4 %, чувствительность определяется свойствами аналитической линии, составом пробы, классом аппаратуры и может достигать 0,001 мкг/мл.

Атомная абсорбция – это процесс, при котором атом в невозбужденном состоянии поглощает электромагнитное излучение с определенной энергией (длиной волны) и переходит в возбужденное состояние.

Определение проводится при длине волны одной из резонансных линий элемента. Количество поглощенного излучения, согласно закону Бугера - Ламберта- Бера, пропорционально концентрации элемента:

$$I=I_0e^{-acl}, \text{ где}$$

I_0 - интенсивность падающего излучения;

I – интенсивность излучения, прошедшего через вещество;

a - показатель поглощения света, рассчитанный на единицу концентрации поглощающего компонента и на единицу толщины слоя;

c - концентрация поглощающего компонента;

l - толщина поглощающего слоя.

Принцип метода.

Резонансное излучение от лампы проходит через слой атомного пара, получаемого с помощью атомизатора. Излучение попадает на входную щель монохроматора, установленного таким образом, что из спектра выделяется только резонансная линия определяемого элемента, интенсивность которой измеряется фотоэлектрическим способом. Измеряют уменьшение интенсивности резонансной линии вследствие поглощения ее атомами определяемого элемента, принимая интенсивность неослабленной линии за 100 %. Величина поглощения резонансного излучения пропорциональна числу атомов, находящихся в поглощающем слое.

Прибор.

Главными составными частями прибора являются:

- источник излучения;
- устройство ввода пробы;
- атомизатор образца;
- монохроматор или полихроматор;
- детектор;
- устройство для регистрации информации.

Для каждого определяемого элемента должен быть выбран специфический источник, излучающий спектральную линию, которая должна быть абсорбирована. Таким источником излучения являются полая катодная лампа, безэлектродная разрядная лампа (главным образом для определения As, Se, Te, P, Hg, Rb, Cs). Поскольку излучение, абсорбируемое измеряемым элементом, обычно той же длины волны, что и его линия эмиссии, в полой

катодной лампе используется тот элемент, который определяется. Требуемая спектральная линия может быть выделена с помощью монохроматора высокого разрешения из сплошного спектра, излучаемого дуговой ксеноновой лампой.

Для коррекции фонового излучения может быть использована дейтериевая лампа с постоянной эмиссией, у которой измерено фоновое поглощение. Использование коррекции фона с помощью эффекта Зеемана устраняет мешающие линии и мешающие факторы при молекулярном поглощении при электротермической технике атомизации. Фон может быть также измерен путем регистрации значений абсорбции на участке спектра около резонансной линии и затем вычитанием этого значения из результатов, полученных в линии резонанса.

Существует следующие способы атомизации образца: пламенная, электротермическая, метод холодного пара и гидридный метод.

Пламенная атомизация.

Испытуемый образец вводится в пламя через распылительную систему в виде аэрозоля. Для создания пламени с нужной температурой используют газовые смеси, состоящие из горючих газов (пропан, водород, ацетилен) и окислителей (воздух, закись азота).

Так как для реализации метода нужны невозбужденные атомы, а атомы в возбужденном состоянии способны испускать излучение на характерных резонансных линиях, следует избегать чрезмерного образования возбужденных атомов, что может привести к существенным искажениям закона Бугера-Ламберта-Бера. Число возбужденных атомов увеличивается с ростом температуры, которая зависит в основном от теплотворной способности создающего пламя газа (табл. 1).

Таблица 1Температура наиболее часто используемых газовых смесей

Состав газовой смеси	**Температура, °С**
Светильный газ + воздух	1840
Ацетилен + воздух	2250
Ацетилен + кислород	3050

Водород + кислород	2680
Ацетилен + закись азота	2955

Электротермическая атомизация.

Электротермический атомизатор состоит из нагреваемой графитовой трубки (печи) и источника электроэнергии. Образцы как жидкие, так и твердые вводятся непосредственно в графитовую трубку, которая нагревается поэтапно, с помощью программного управления: на первом этапе удаляется растворитель, на втором – удаляются основные компоненты матрицы и затем атомизируется остаток пробы. Две первые стадии обычно проводят в токе инертного газа (аргона), чтобы избежать какого-либо окисления. Поток аргона останавливают во время атомизации. Анализируемый элемент в образце полностью атомизируется, и его атомы остаются в трубке, расположенной по ходу светового луча, в течение длительного периода времени. В результате, чувствительность и пределы обнаружения элементов существенно улучшаются. Печь очищается путем нагревания до температуры выше, чем температура атомизации.

Метод холодного пара и гидридный метод.

Атомный пар может быть получен также вне спектрометра, например, методом «холодного пара» для определения ртути или гидридным методом. При определении ртути атомы генерируются при химическом восстановлении с хлоридом олова или борогидридом натрия, атомный пар вносится потоком инертного газа в абсорбционную ячейку, расположенную на оптическом пути прибора. В гидридном методе получают гидрид определяемого элемента, который либо смешивается с газом, питающим горелку, либо вносится инертным газом в нагретую абсорбционную ячейку, где он диссоциирует на атомы.

В атомно-абсорбционной спектрометрии должна учитываться природа растворителя и концентрация твердых частиц. Идеальным считается растворитель с минимальными помехами в процессах поглощения или эмиссии,

при использовании которого в пламени образуются нейтральные атомы. Если имеются значительные различия между поверхностным натяжением или вязкостью испытуемого раствора и стандартного раствора, то эти растворы всасываются и атомизируются с различной скоростью, что обуславливает существенное различие в генерированных сигналах. Концентрация кислоты в растворах также влияет на процессы абсорбции. Таким образом, растворители, используемые для приготовления испытуемого и стандартного растворов в методе ААС, должны быть одними и теми же или максимально похожими и должны образовывать растворы, которые легко всасываются через трубку форсунки аспиратора.

Присутствие в растворе частиц нерастворенного твердого вещества может вызвать помехи при проведении анализа, поэтому общее содержание нерастворимых твердых частиц в растворах должно быть менее 2 %.

В состав стандартных и испытуемых растворов могут вводиться различные модификаторы. Так для предотвращения ионизационных помех используют избыток цезия и лантана. В электротермической атомизации применяют химические модификаторы, обычно представляющие собой растворы неорганических солей (например, нитраты магния или аммония) для предотвращения реакций определяемого элемента с поверхностью графита.

Методика.

Для подготовки образца может потребоваться растворение или минерализация (сухое озоление, влажная минерализация или микроволновое разложение).

При приготовлении растворов рекомендуется использование пластиковой лабораторной посуды во всех возможных случаях.

Прибор выводят на рабочий режим в соответствии с инструкцией по эксплуатации прибора и устанавливают требуемую длину волны. В генератор атомного пара вводят холостой раствор и настраивают регистрирующее устройство на максимальное светопропускание. Вводят стандартный раствор определяемого элемента с наибольшей концентрацией и подбирают

чувствительность для получения подходящего значения регистрируемого сигнала.

Определение проводят путем сравнения величины поглощения испытуемого раствора и стандартного раствора с известными концентрациями определяемого элемента методом калибровочной кривой (метод 1) или методом стандартных добавок (метод 2) как указано ниже.

Метод 1 – метод калибровочной кривой

Готовят не менее трех стандартных растворов определяемого элемента и холостой раствор, измеряют их поглощение. Стандартные растворы готовят таким образом, чтобы ожидаемое значение концентраций испытуемого раствора находилось внутри диапазона концентраций стандартных растворов.

Раствор испытуемого вещества готовят, как указано в фармакопейной статье.

Для количественных определений оптимальные концентрации стандартных растворов должны быть в пределах от 0,7 до 1,3 ожидаемой концентрации определяемого элемента или в диапазоне, указанном в фармакопейной статье. Для испытания на чистоту, концентрации стандартных растворов находятся в диапазоне от предела обнаружения и 1,2 предела содержания определяемого элемента. Любые реактивы, используемые при приготовлении испытуемого раствора, прибавляют в холостой раствор и стандартные растворы в таких же количествах, как и в испытуемый раствор.

Все растворы вводят в прибор в одинаковом количестве повторностей для получения устойчивых показаний.

Расчеты. Строят калибровочную кривую зависимости средних значений абсорбции стандартных растворов от концентрации определяемого элемента. По графику определяют концентрацию элемента в испытуемом растворе. Для обработки данных обычно применяются линейные функции. В отдельных случаях, при невозможности получения линейной зависимости, могут быть использованы квадратичные функции. Использование квадратичной функции должно быть обосновано. Если в фармакопейной статье не указано иного,

коэффициент корреляции калибровочной кривой должен быть не менее 0,99.

Метод 2 – метод стандартных добавок

Испытуемый раствор готовят, как указано в фармакопейной статье. Равные объемы испытуемого раствора помещают не менее чем в три мерные колбы одинаковой вместимости. Для получения ряда разведений в две колбы добавляют пропорционально увеличивающиеся объемы эталонного раствора определяемого элемента. Доводят содержимое каждой колбы растворителем до метки. При этом значение эмиссии или абсорбции растворов со стандартными добавками должно находиться в линейной области калибровочной кривой.

Все растворы вводят в генератор одинаковое количество раз, чтобы получить установившееся показание.

Расчеты. Методом наименьших квадратов рассчитывают линейное уравнение калибровочной кривой и из него получают концентрацию определяемого элемента в испытуемом растворе.

Расчет концентрации может быть произведен графическим методом. Для этого строят график зависимости среднего значения результата измерения от добавленного количества определяемого элемента. Экстраполируют линию, соединяющую эти точки на графике, до пересечения с осью абсцисс. Расстояние от начала координат до полученной точки пересечения дает концентрацию определяемого элемента в испытуемом растворе.

При использовании ААС для определения концентрации элемента в анализируемых образцах наряду с приведенными выше методами (калибровочной кривой и стандартных добавок) могут быть использованы метод сравнения и метод ограничивающих растворов. При этом должно быть подтверждено, что концентрация раствора сравнения находится в линейной области и не превышает предельно допустимое содержание элемента в испытуемом растворе (для испытания на чистоту).

Реактивы и эталонные растворы.

Вода должна быть деионизированной на ионообменных смолах,

продистиллированной непосредственно перед употреблением и должна соответствовать требованиям, предъявляемым к воде очищенной.

Ниже приведены растворы солей, катионы которых обозначены названиями элементов, наиболее часто нормируемых в фармацевтическом анализе.

Кальций. 1,001 г кальция карбоната, высушенного до постоянной массы при температуре 105 °С, растворяют в 25 мл 1 М раствора хлористоводородной кислоты и доводят объем раствора водой до 1000,0 мл. Раствор содержит 400 мкг ионов Ca в 1 мл.

Срок годности раствора – 1 мес, хранение при комнатной температуре.

Калий. 1,1440 г калия хлорида, высушенного до постоянной массы при температуре 130 °С, растворяют в небольшом количестве воды и доводят объем раствора водой до 1000,0 мл. Раствор содержит 600 мкг ионов K в 1 мл.

Срок годности раствора – 2 мес, хранение при комнатной температуре.

Натрий. 0,5084 г натрия хлорида, высушенного до постоянной массы при температуре 130 °С, растворяют в небольшом количестве воды и доводят объем раствора водой до 1000,0 мл. Раствор содержит 200 мкг ионов Na в 1 мл.

Срок годности раствора 2 мес, хранение при комнатной температуре.

Цинк. 2,5 г гранулированного цинка растворяют в 20 мл 5 М раствора хлористоводородной кислоты и доводят объем раствора водой до 500,0 мл. Раствор содержит 5 мг ионов Zn в 1 мл.

Срок годности раствора – 2 мес, хранение при комнатной температуре.

Свинец. 0,1600 г свинца нитрата растворяют в 5 мл 32 % раствора азотной кислоты и доводят объем раствора водой до 1000,0 мл. Раствор содержит 100 мкг ионов Pb в 1 мл.

Срок годности раствора 1 мес, хранение при комнатной температуре.

Медь. 1,000 г меди электролитической растворяют в небольшом объеме 50 % раствора азотной кислоты и доводят объем раствора 1 % азотной кислотой до 1000,0 мл. Раствор содержит 1 мг ионов Cu в 1 мл.

Срок годности раствора – 1 мес, хранение при комнатной температуре.

Допускается использование других реактивов и эталонных растворов для спектрального анализа, аттестованных компетентным уполномоченным органом.

Расчет количества соединения химического элемента (X) в граммах при составлении эталонного раствора проводят по следующей формуле:

$$X = a \cdot b \cdot \frac{M}{n \cdot A}, \qquad \text{где}$$

a – масса вводимого в раствор элемента на 1 г готового эталонного раствора, г;

b – масса готового эталонного раствора, г;

M – молекулярная масса соединения, в которое входит вводимый в эталонный раствор элемент;

n – число атомов вводимого элемента в используемом для приготовления эталонного раствора соединении;

A – атомная масса вводимого в эталонный раствор элемента.

Эталонные, а также приготовленные на их основе стандартные растворы хранят в посуде, позволяющей сохранять концентрацию этих растворов неизменной (например, в посуде из кварца, тефлона, чистого полиэтилена и т.п.).

Флуориметрия **ОФС.1.2.1.1.0006.15**

Взамен ГФ X

Взамен ст. ГФ XI, вып.1

Взамен ГФ XII, ч.1, ОФС 42-0045-07

Флуориметрия (или флуоресцентная спектрофотометрия) является методом анализа, основанным на измерении флуоресценции. Флуоресценция (один из видов люминесценции) – испускание света химическим веществом, находящимся в возбуждённом состоянии, при переходе в основное состояние. Первоначальный переход вещества из основного в возбуждённое состояние происходит при этом виде люминесценции за счёт поглощения им световой энергии при облучении ультрафиолетовым, видимым или иным электромагнитным излучением. Флуоресценция органических соединений охватывает спектральную область от 200 до 830 нм.

Как правило, длина волны флуоресцентного излучения больше длины волны возбуждения на 20 – 30 нм и более из-за потери части энергии в возбуждённом состоянии (Стоксов сдвиг). Поглощение и испускание излучения осуществляется благодаря переходу электронов между различными энергетическими уровнями или молекулярными орбиталями. Испускание света происходит через определённый промежуток времени после его поглощения; этот промежуток времени представляет собой длительность пребывания молекулы в возбуждённом состоянии. Для большинства флуоресцирующих

веществ время затухания флуоресценции составляет обычно 10^{-9} – 10^{-8} с. Короткое время жизни флуоресценции отличает этот тип люминесценции от фосфоресценции, которая представляет собой долгоживущее свечение, имеющее время жизни от 10^{-3} с до нескольких мин.

Метод флуориметрии в 10 – 100 раз чувствительнее абсорбционной спектрофотометрии, но флуоресцентными свойствами обладает только ограниченный круг соединений: ароматические, особенно с конденсированными структурами, гетероциклические и карбонильные соединения. Из фармацевтических субстанций определению методом флуориметрии подлежат аминокислоты (фенилаланин, триптофан, тирозин), алкалоиды (стрихнин, резерпин, хинин), витамины (фолиевая кислота, рибофлавин, ретинола ацетат), стероидные гормоны (этинилэстрадиол).

Интенсивность флуоресценции измеряется в условных единицах, пропорциональных отклику детектора и обозначается символом *I*.

Спектр испускания флуоресценции представляет собой зависимость интенсивности флуоресценции от длины волны (в нм) или частоты (в $см^{-1}$) при заданной длине волны возбуждения. *Спектр возбуждения флуоресценции* представляет собой зависимость интенсивности излучения в максимуме испускания флуорофора от длины волны или частоты возбуждающего света. При этом спектр возбуждения обычно совпадает со спектром поглощения, так же как и интенсивность флуоресценции пропорциональна светопоглощению. Комбинирование спектров испускания, полученных при различных длинах волн возбуждения, даёт трёхмерную карту испускания.

Приборы. Для проведения флуориметрического анализа используют приборы двух типов: *фильтрационный флуориметр* и *спектрофлуориметр*.

Фильтрационный флуориметр состоит из источника излучения, первичного фильтра длин волн, камеры для образца, вторичного фильтра длин волн и системы детектирования флуоресценции. Как правило, детектор

помещен под углом 90^{o} к возбуждающему световому потоку. Геометрия прямого угла предусматривает детектирование только произведенного флуоресцентного сигнала. Однако детектор все-таки получает часть возбуждающего излучения в результате рассеивающих свойств самого раствора, а также из-за присутствия в растворе твердых частиц. Для устранения этого остаточного рассеяния используются спектральные фильтры. Первичный фильтр отбирает коротковолновое излучение, способное к возбуждению испытуемых образцов, вторичный фильтр пропускает флуоресценцию в длинноволновой области, но блокирует рассеянное возбуждение.

Детекторы флуориметров преобразуют оптический сигнал в электрический с помощью фотоумножителей разных типов. Каждый тип детектора имеет специальные характеристики: спектральная область максимальной чувствительности, степень усиления, соотношение сигнал/шум.

Спект рофлуоримет ры отличаются от фильтрационных флуориметров тем, что вместо спектральных фильтров в них используются монохроматоры типа призмы или решетки. Эти приборы более предпочтительны для аналитических целей. В спектрофлуориметрах монохроматоры снабжены щелями. Чем уже щель, тем выше разрешение и спектральная чистота, но меньше чувствительность. Выбор размера щели определяется разделением между длинами волн возбуждающего и испускаемого излучения и необходимым уровнем чувствительности.

В качестве источников возбуждающего излучения в флуориметрах используют:

- ртутные лампы низкого давления, предоставляющие большое количество длин волн возбуждения, но не являющиеся источником излучения равномерного спектра;

- ксеноновые газоразрядные лампы, обеспечивающие высокоинтенсивное почти равномерное излучение в широком диапазоне спектра (300 – 800 нм) и

достаточно интенсивное в коротковолновой области вплоть до 200 нм;

- лазеры, излучающие свет высокой интенсивности в очень узком интервале длин волн (не более 0,01 нм) и позволяющие благодаря этому не использовать монохроматоры или первичные светофильтры;

- светодиоды и светодиодные матрицы, излучающие свет в определённых диапазонах длин волн.

Для размещения анализируемых проб в флуориметрах используют, как правило, прямоугольные кварцевые кюветы, отполированные со всех 4 вертикальных сторон, иногда – цилиндрические кюветы или пробирки. Обычно объем испытуемых образцов составляет 2 – 3 мл, но к некоторым приборам прилагаются кюветы вместимостью от 100 до 300 мкл или капиллярные держатели для еще меньшего объема.

Измерение флуоресценции. Флуоресценцию определяют в растворах с концентрацией от 10^{-5} М и менее, в диапазоне, для которого наблюдается прямая зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации. При более высоких концентрациях всё более значительная часть поступающего света абсорбируется образцом вблизи поверхности кюветы, и линейная зависимость величины сигнала от концентрации определяемого вещества нарушается.

Все замеры интенсивности флуоресценции должны быть скорректированы с растворителем.

Интенсивность флуоресценции зависит от:

- температуры,
- растворителя,
- величины pH испытуемого раствора,
- присутствия в растворе посторонних частиц,
- концентрации кислорода в испытуемом растворе,
- постороннего освещения.

Эффективность флуоресценции обратно пропорциональна температуре.

Для некоторых веществ эффективность флуоресценции может снижаться на 1 – 2 % при повышении температуры на 1 ^{o}C. В таких случаях требуется термостатирование образцов.

Интенсивность и спектральное распределение флуоресценции зависит от растворителя. Многие соединения, флуоресцирующие в органических растворителях, фактически не флуоресцируют в воде.

Перед измерением флуоресценции из испытуемого раствора фильтрованием или центрифугированием должны быть удалены твёрдые частицы, так как они могут поглощать некоторую долю возбуждающей энергии, дезактивировать возбужденные молекулы или завышать измеряемую величину из-за многократных отражений в кювете с образцом.

Интенсивность флуоресценции обратно пропорциональна концентрации кислорода, являющегося сильным гасителем флуоресценции. По степени тушения флуоресценции можно определять концентрацию кислорода в окружающей среде. Для удаления кислорода через испытуемый образец пропускают азот или гелий.

Большинство флуоресцирующих веществ чувствительно к свету. Во время облучения во флуориметре они могут подвергаться фоторазложению с образованием других флуоресцирующих продуктов. Такие эффекты обнаруживаются при наблюдении за откликом детектора во времени и могут быть снижены путём приглушения света с помощью светофильтров или экранов.

Применение флуориметрии в фармацевтическом анализе

Идент ификация. Спектры флуоресценции специфичны для определяемых веществ. Поэтому флуоресценция может быть применена для их идентификации.

Количест венный анализ. При количественных определениях интенсивность флуоресценции раствора испытуемого образца сравнивают с

интенсивностью флуоресценции раствора стандартного образца флуоресцирующего вещества известной концентрации, измеренной в идентичных условиях на одном и том же приборе.

Мет одика. Растворяют испытуемый образец в растворителе или в смеси растворителей, указанных в нормативной документации. Переносят раствор в кювету или пробирку флуориметра и облучают возбуждающим светом при длине волны, указанной в нормативной документации.

Измеряют интенсивность испускаемого света под углом 90^{o} к возбуждающему свету после прохождения через светофильтр или монохроматор, пропускающий преимущественно испускаемый диапазон длин волн.

Последоват ельност ь выполнения анализа. Вначале в прибор помещают растворитель или смесь растворителей, используемых для растворения вещества, и устанавливают регистрирующее устройство на нулевое значение. Затем вводят раствор стандартного образца и устанавливают чувствительность прибора таким образом, чтобы отклик показаний был не менее 50. Если для регулировки чувствительности требуется изменение ширины щели, должны быть повторены обнуление прибора на растворитель и измерение интенсивности флуоресценции стандартного образца. После этого вводят растворы испытуемых образцов неизвестной концентрации и регистрируют показания прибора. В случае линейной зависимости интенсивности испускаемого света от концентрации вещества рассчитывают последнюю в испытуемом растворе (C) по формуле:

$$C = \frac{I \cdot C_0}{I_0},$$

где C_0 – концентрация вещества в стандартном растворе;

I – интенсивность света, испускаемого испытуемым раствором;

I_0 – интенсивность света, испускаемого стандартным раствором.

Если интенсивность флуоресценции не прямо пропорциональна концентрации раствора, измерение может быть произведено с использованием калибровочной кривой.

В некоторых случаях измерение флуоресценции испытуемого образца может быть выполнено относительно независимого стандарта (например, флуоресцентного стекла или раствора другого флуоресцентного вещества). В качестве стандартов могут быть использованы: раствор известной концентрации хинина в 0,05 М растворе серной кислоты или раствор флуоресцеина в 0,1 М растворе натрия гидроксида. В таких случаях концентрацию испытуемого образца следует определять с использованием предварительно полученной в тех же условиях калибровочной кривой.

Спектроскопия ядерного магнитного резонанса **ОФС.1.2.1.1.0007.15**

Спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР) – метод, основанный на поглощении радиочастотного электромагнитного излучения ядрами образца с ненулевым магнитным моментом, помещенного в постоянное магнитное поле (B_0). Ненулевые магнитные моменты имеют изотопы ядер элементов с нечетной атомной массой (^{1}H, ^{13}C, ^{15}N, ^{19}F, ^{31}P и др.).

Общие принципы. Вращающееся вокруг своей оси ядро имеет собственный момент количества движения (угловой момент, или спин) P. Магнитный момент ядра μ прямо пропорционален спину: $\mu = \gamma \cdot P$ (γ – коэффициент пропорциональности или гиромагнитное отношение). Угловой и магнитный моменты являются квантованными, т.е. могут находиться в одном из $2I + 1$ спиновых состояний (I – *спиновое квантовое число*). Различные состояния магнитных моментов ядер обладают одинаковой энергией, если на них не действует внешнее магнитное поле. При помещении ядер во внешнее магнитное поле B_0 энергетическое вырождение ядер снимается и возникает возможность энергетического перехода с одного уровня на другой. Процесс распределения ядер между различными энергетическими уровнями протекает в соответствии с законом распределения Больцмана и приводит к появлению макроскопической равновесной продольной намагниченности M_z. Время, которое требуется для

создания M_z после включения внешнего магнитного поля B_0, называется временем *продольной* или *спин-решеточной релаксации* (T_1). Нарушение равновесного распределения ядер происходит под действием радиочастотного магнитного поля (B_1), перпендикулярного B_0, которое вызывает дополнительные переходы между энергетическими уровнями, сопровождающиеся поглощением энергии (явление *ядерного магнитного резонанса)*. Частота ν_0, при которой возникает поглощение энергии ядрами (*Ларморова* или *резонансная частота поглощения*), изменяется в зависимости от величины постоянного поля B_0: $\nu_0 = \gamma B_0/2\pi$. В момент резонанса происходит взаимодействие между индивидуальными ядерными магнитными моментами и полем B_1, которое выводит вектор M_z из его равновесного положения вдоль оси *z*. В результате появляется *поперечная намагниченность* M_{xy}. Ее изменение, связанное с обменом внутри спиновой системы, характеризуется временем *поперечной* или *спин-спиновой релаксации* (T_2).

Зависимость интенсивности поглощения энергии ядрами одного типа от частоты радиочастотного магнитного поля при фиксированном значении B_0 называется *одномерным спектром ядерного магнитного резонанса* ядра данного типа. Спектр ЯМР может быть получен двумя способами: при непрерывном облучении образца радиочастотным полем с изменяющейся частотой, в результате чего регистрируется непосредственно спектр ЯМР (спектроскопия с непрерывным облучением), или при воздействии на образец короткого радиочастотного импульса (*импульсная спектроскопия*). В импульсной спектроскопии ЯМР регистрируется затухающее во времени когерентное излучение, испускаемое ядрами при возвращении в исходное спиновое состояние (*сигнал спада свободной индукции*) с последующим преобразованием временной шкалы в частотную (*Фурье-преобразование*).

В молекулах электроны атомов уменьшают величину действующего внешнего магнитного поля B_0 в месте нахождения ядра, т.е. проявляется *диамагнитное экранирование*:

$$B_{лок} = B_0 \cdot (1 - \sigma),$$

где $B_{лок}$ – напряженность результирующего поля;

σ – константа экранирования.

Разница в резонансных частотах сигналов ядер, равная разнице в их константах экранирования, называется *химическим сдвигом* сигналов, обозначается символом δ, измеряется в миллионных долях (м.д.). Взаимодействие магнитных моментов ядер через посредство электронов химической связи (*спин-спиновое взаимодействие*) вызывает расщепление сигнала ЯМР (*мультиплетность, m*). Количество компонент в мультиплетах определяется спином ядра и количеством взаимодействующих ядер. Мерой спин-спинового взаимодействия является *константа спин-спинового взаимодействия* (J, измеряется в герцах, Гц). Значения δ, m и J не зависят от величины постоянного магнитного поля.

Интенсивность сигнала ЯМР ядра в спектре определяется заселенностью его энергетических уровней. Из ядер с естественным содержанием изотопов наиболее интенсивные сигналы дают ядра водорода. На интенсивность сигналов ЯМР также влияет время продольно-поперечной релаксации (большие T_1 ведут к уменьшению интенсивности сигнала).

Ширина сигналов ЯМР (разница между частотами на полувысоте сигнала) зависит от T_1 и T_2. Малые времена T_1 и T_2 обуславливают широкие и мало интерпретируемые сигналы спектра.

Чувствительность метода ЯМР (предельно обнаруживаемая концентрация вещества) зависит от интенсивности сигнала ядра. Для ядер ^{1}H чувствительность составляет $10^{-9} \div 10^{-11}$ моль.

Корреляции различных спектральных параметров (например, химических сдвигов различных ядер в пределах одной молекулярной системы) могут быть получены гомо- и гетероядерными методами в формате 2D или 3D.

Прибор. Импульсный спектрометр ЯМР (ЯМР-спектрометр) с высокой разрешающей способностью состоит из:

– магнита для создания постоянного магнитного поля B_0;
– термостатируемого датчика с держателем образца для подачи радиочастотного импульса и определения излучения, испускаемого образцом;
– электронного устройства для создания радиочастотного импульса, регистрации, усиления и преобразования сигнала спада свободной индукции в цифровую форму;
– устройства для настройки и регулировки электронных контуров;
– устройства сбора и обработки данных (компьютер);

и может также включать:

проточную кювету для проведения жидкостной хроматографии ядерного магнитного резонанса или проточно-инъекционного анализа;

– систему для создания импульсного градиента магнитного поля.

Сильное магнитное поле генерируется катушкой сверхпроводимости в сосуде Дьюара, заполненном жидким гелием.

Следует проверять надлежащее функционирование ЯМР-спектрометра. Для проверки проводят соответствующие испытания, включающие, как правило, измерение ширины спектральной линии на полувысоте определенных пиков при определенных условиях (*разрешение*), воспроизводимость положения сигнала и отношение сигнал/шум (отношение между интенсивностью определенного сигнала в спектре ЯМР и случайных колебаний в области спектра, не содержащего сигналов от анализируемого вещества, *S*/*N*) для стандартных смесей. В программном обеспечении спектрометров имеются алгоритмы по определению *S/N*. Все изготовители приборов предоставляют спецификации и протоколы измерения этих параметров.

Спектроскопия ЯМР образцов в растворах

Методика. Испытуемый образец растворяют в растворителе, к которому может быть добавлен соответствующий эталон для калибровки химического сдвига, как указано в нормативной документации. Величина

относительного химического сдвига ядра вещества ($\delta_{в\text{-}во}$) определяется следующим выражением:

$$\delta_{в\text{-}во} = (\nu_{в\text{-}во} - \nu_{эталон})/\nu_{прибора},$$

где $\nu_{в\text{-}во}$ – частота резонанса ядра вещества, Гц;

$\nu_{эталон}$ – частота резонанса ядра эталона, Гц;

$\nu_{прибора}$ – рабочая частота ЯМР-спектрометра (частота, на которой выполняются условия резонанса для ядер водорода при данном B_0, МГц).

Для растворов в органических растворителях химический сдвиг в спектрах ^{1}H и ^{13}C измеряется относительно сигнала тетраметилсилана, положение которого принято за 0 м.д. Отсчет химических сдвигов ведется в сторону слабого поля (влево) от сигнала тетраметилсилана (дельта – шкала химических сдвигов). Для водных растворов в качестве эталона в спектрах ЯМР ^{1}H используется 2,2-диметил-2-силанпентан-5-сульфонат натрия, химический сдвиг протонов метильной группы которого равен 0,015 м.д. Для спектров ^{13}C водных растворов в качестве эталона используют диоксан, химический сдвиг которого равен 67,4 м.д.

При калибровке спектров ^{19}F в качестве первичного эталона с нулевым значением химического сдвига используют трифторуксусную кислоту или трихлорфторметан; спектров ^{31}P – 85 % раствор ортофосфорной кислоты или триметилфосфат; спектров ^{15}N – нитрометан либо насыщенный раствор аммиака. В ^{1}H и ^{13}C ЯМР, как правило, используют внутренний эталон, который непосредственно прибавляют к испытуемому образцу. В ^{15}N, ^{19}F и ^{31}P ЯМР часто используют внешний эталон, который находится отдельно в коаксиальной цилиндрической пробирке или капилляре.

При описании спектров ЯМР необходимо указывать растворитель, в котором растворено вещество, и его концентрацию. В качестве растворителей используют легкоподвижные жидкости, в которых для уменьшения интенсивности сигналов растворителей атомы водорода заменены атомами дейтерия. Дейтерированный растворитель выбирают, исходя из следующих критериев:

1) растворимости в нем испытуемого соединения;

2) отсутствия перекрывания сигналов остаточных протонов дейтерированного растворителя с сигналами испытуемого соединения;

3) отсутствия взаимодействия между растворителем и испытуемым соединением, если не указано иначе.

Атомы растворителя дают сигналы, которые легко идентифицируются по их химическому сдвигу и могут использоваться для калибровки оси химического сдвига (вторичный эталон). Химические сдвиги сигналов остаточных протонов дейтерированных растворителей имеют следующие значения (м.д.): хлороформ – 7,26; бензол – 7,16; вода – 4,7; метанол –3,35 и 4,78; диметилсульфоксид – 2,50; ацетон – 2,05; положение сигнала воды и протонов гидроксильных групп спиртов зависит от pH среды и температуры.

Для количественного анализа растворы не должны содержать нерастворенных частиц. При некоторых количественных определениях может потребоваться добавление внутреннего стандарта для сравнения интенсивности испытуемого и стандартного образцов. Соответствующие стандартные образцы и их концентрации должны быть указаны в нормативной документации. После помещения образца в пробирку и укупорки образец вводят в магнит ЯМР-спектрометра, устанавливают параметры испытания (параметры настройки, регистрации, оцифровки сигнала спада свободной индукции). Основные параметры испытания, приводимые в нормативной документации, записывают или сохраняют в компьютере.

Для предотвращения дрейфа спектра во времени выполняют стабилизационную процедуру (дейтериевый лок), используя сигнал дейтерия, вызываемый дейтерированными растворителями, если не указано иначе. Прибор регулируют для получения наиболее оптимальных условий резонанса и максимального соотношения *S/N* (*шиммирование*).

В ходе испытания возможно выполнение многократных последовательностей циклов «импульс – сбор данных – пауза» с

последующим суммированием отдельных сигналов спада свободной индукции и усреднением уровня шума. Время задержки между импульсными последовательностями, в течение которого система ядерных спинов восстанавливает свою намагниченность (D_1), для количественных измерений должно превышать время продольной релаксации T_1: $D_1 \geq 5\,T_1$. В программном обеспечении спектрометров имеются алгоритмы по определению T_1. Если величина T_1 неизвестна, рекомендуется использовать значение $D_1 = 25$ с.

При количественных измерениях рекомендуется проводить испытание без вращения образца во избежание появления боковых сигналов.

После проведения Фурье-преобразования сигналы в частотном представлении калибруют под выбранный эталон и измеряют их относительную интенсивность путем интегрирования – измерения отношения площадей резонансных сигналов. В спектрах ^{13}C интегрируют только однотипные сигналы. Точность интегрирования сигнала зависит от соотношения *сигнал – шум* (*S/N)*:

$$u(I)\% = 0{,}25 + \frac{100}{S/N},$$

где $u(I)$ – стандартная неопределенность интегрирования.

Число накоплений спада свободной индукции, необходимое для достижения удовлетворительного соотношения *S/N*, должно быть приведено в нормативной документации.

Наряду с одномерными в аналитических целях используют гомо- и гетероядерные двумерные корреляционные спектры, основанные на определенной последовательности импульсов (COSY, NOESY, ROESY, HSQC, HMBC, HETCOR, CIGAR, INADEQUATE и др.). В двумерных спектрах взаимодействие между ядрами проявляется в виде сигналов, называемых кросс-пиками. Положение кросс-пиков определяется значениями химических сдвигов двух взаимодействующих ядер. Двумерные спектры предпочтительно использовать для определения состава сложных смесей и экстрактов, т.к. вероятность наложения сигналов (кросс-пиков) в двумерных

спектрах существенно ниже, чем вероятность наложения сигналов в одномерных спектрах.

Для быстрого получения спектров гетероядер (^{13}C, ^{15}N и др.) применяют методики (HSQC, HMBC), которые позволяют получать на ядрах ^{1}H спектры других ядер, используя механизмы гетероядерного взаимодействия.

Методика DOSY, основанная на регистрации потери фазовой когерентности ядерных спинов за счет трансляционных перемещений молекул под действием градиента магнитного поля, позволяет получать спектры индивидуальных соединений (спектральное разделение) в смеси без их физического разделения и определять размеры, степени агрегированности и молекулярные массы молекулярных объектов (молекул, макромолекул, молекулярных комплексов, супрамолекулярных систем).

Области применения. Многообразие структурной и аналитической информации, содержащейся в спектрах ядерного магнитного резонанса, позволяет использовать метод ядерного магнитного резонанса для проведения качественного и количественного анализа. Применение спектроскопии ядерного магнитного резонанса в количественном анализе основано на прямой пропорциональности молярной концентрации магнитно-активных ядер интегральной интенсивности соответствующего сигнала поглощения в спектре.

1. ***Установление подлинности действующего вещества****.* Установление подлинности действующего вещества осуществляют путем сравнения спектра испытуемого образца со спектром стандартного образца (первичного или вторичного) или с опубликованным эталонным спектром. Спектры стандартных и испытуемых образцов должны быть получены с использованием одних и тех же методик и условий. Пики в сравниваемых спектрах должны совпадать по положению (отклонения значений δ испытуемого и стандартных образцов в пределах ± 0,1 м.д. для ядерного магнитного резонанса ^{1}H и ± 0,5 м.д. для ядерного магнитного резонанса ^{13}C),

интегральной интенсивности и мультиплетности, значения которых следует приводить при описании спектров.

При подтверждении подлинности образцов нестехиометрического состава (например, природных полимеров переменного состава) допускают несовпадение пиков испытуемого и стандартных образцов по положению и интегральной интенсивности сигналов. Сравниваемые спектры должны быть подобны, т.е. содержать одинаковые характеристические области сигналов, подтверждающие совпадение фрагментного состава испытуемого и стандартных образцов.

Для установления подлинности смеси веществ (экстрактов) допускают использование одномерных спектров ЯМР целиком, как «отпечатков пальца» объекта, без детализации значений δ и мультиплетности отдельных сигналов. В случае использования двумерной спектроскопии ЯМР при описании спектров (фрагментов спектра), заявленных на подлинность, следует приводить значения кросс-пиков.

2. ***Идентификация посторонних примесей/остаточных органических растворителей****.* Идентификацию посторонних примесей/остаточных органических растворителей осуществляют аналогично установлению подлинности действующего вещества, ужесточая требования к чувствительности и цифровому разрешению.

3. ***Определение содержания посторонних примесей/остаточных органических растворителей относительно действующего вещества****.* Метод ЯМР является прямым абсолютным методом определения мольного соотношения действующего вещества и примесного соединения ($n/n_{\text{примесь}}$):

$$\frac{S'}{S'_{\text{примесь}}} = \frac{n}{n_{\text{примесь}}},$$

где S' и $S'_{\text{примесь}}$ – нормированные значения интегральных интенсивностей сигналов действующего вещества и примеси.

Нормирование проводят по числу ядер в структурном фрагменте, обуславливающих измеряемый сигнал.

Массовую долю примеси/остаточного органического растворителя относительно действующего вещества ($X_{пр}$) определяют по формуле:

$$X_{пр} = \frac{M_{пр} \cdot S'_{пр}}{M \cdot S'},$$

где $M_{пр}$ – молекулярная масса примеси;

M – молекулярная масса действующего вещества;

$S'_{пр}$ – нормированное значение интегральной интенсивности сигнала примеси;

S' – нормированное значение интегральной интенсивности сигнала действующего вещества.

4. ***Количественное определение содержания вещества (действующего вещества, примеси/остаточного растворителя) в фармацевтической субстанции. Абсолютное содержание вещества*** в фармацевтической субстанции определяется методом внутреннего стандарта, в качестве которого выбирается вещество, сигналы которого находятся вблизи сигналов определяемого вещества, не перекрываясь с ними. Интенсивности сигналов определяемого вещества и стандарта не должны существенно различаться.

Процентное содержание определяемого вещества в испытуемом образце в пересчете на сухое вещество (X, % $_{масс}$) вычисляют по формуле:

$$X, \%_{масс} = 100 \cdot (S' / S'_0) \cdot (M \cdot a_0 / M_0 \cdot a) \cdot [100/(100 - W)],$$

где S' – нормированное значение интегральной интенсивности сигнала определяемого вещества;

S'_0 – нормированное значение интегральной интенсивности сигнала стандарта;

M – молекулярная масса определяемого вещества;

M_0 – молекулярная масса;

a – навеска испытуемого образца;

a_0 – навеска вещества-стандарта;

W – содержание влаги, %.

В качестве веществ-стандартов можно использовать следующие соединения: малеиновая кислота (2H; 6,60 м.д., M = 116,07), бензилбензоат (2H; 5,30 м.д., M = 212,25), малоновая кислота (2H; 3,30 м.д., M = 104,03), сукцинимид (4H; 2,77 м.д., M = 99,09), ацетанилид (3H; 2,12 м.д., M = 135,16), *трет*-бутанол (9H; 1,30 м.д., M = 74,12).

Относительное содержание вещества как доля компонента в смеси компонентов фармацевтической субстанции определяется методом внутренней нормализации. Мольная ($X_{\text{моль}}$) и массовая ($X_{\text{масс}}$) доля компонента i в смеси n веществ определяется по формулам:

$$X_{i,\,моль} = \frac{S_i^{'}}{\sum_{j=1}^{j=n} S_j^{'}}, \qquad X_{i,\,\text{масс}} = \frac{M_i \cdot S_i'}{\sum_{j=1}^{j=n} M_j \cdot S_j'},$$

$$X_{i,\,\text{моль}}(\%) = X_{\text{моль}} \cdot 100 \quad \text{и} \quad X_{i,\,\text{масс}}(\%) = X_{\text{масс}} \cdot 100.$$

5. ***Определение молекулярной массы белков и полимеров***. Молекулярные массы белков и полимеров определяют сравнением их подвижности с подвижностью соединений-стандартов с известной молекулярной массой, используя методики DOSY. Измеряют коэффициенты самодиффузии (D) испытуемых и стандартных образцов, строят график зависимости логарифмов молекулярных масс соединений-стандартов от логарифмов D. По полученному таким образом графику методом линейной регрессии определяют неизвестные молекулярные массы испытуемых образцов. Полное описание DOSY-эксперимента должно быть приведено в нормативной документации.

Спектроскопия ЯМР твердых веществ

Образцы в твердом состоянии анализируют с помощью специально оборудованных ЯМР-спектрометров. Определенные технические операции (вращение порошкообразного образца в роторе, наклоненном под магическим углом (54,7°) к оси магнитного поля B_0, силовое распаривание, перенос поляризации от легковозбудимых ядер к менее поляризуемым ядрам

– кросс-поляризация) позволяют получать спектры органических и неорганических соединений с высокой разрешающей способностью. Полное описание процедуры должно быть приведено в нормативной документации. Основная область применения данной разновидности спектроскопии ЯМР – изучение полиморфизма твёрдых лекарственных средств.

Масс-спектрометрия	**ОФС.1.2.1.1.0008.15**
	Вводится впервые

Метод масс-спектрометрии – метод качественного и количественного анализа лекарственных средств, основанный на прямом измерении отношений массы к числу элементарных положительных или отрицательных зарядов ионов (*m/z*) в газовой фазе, полученных из испытуемого вещества. Заряд может быть обусловлен присоединением или потерей электрона, протона, катиона или аниона в зависимости от условий ионизации и состава образца. Данное отношение выражается в атомных единицах массы (а.е.м.) или в дальтонах (Да). Ионы, образовавшиеся в ионном источнике прибора, ускоряются и перед попаданием в *детектор* разделяются с помощью масс-анализатора. Эти процессы происходят в камере, в которой насосная система поддерживает вакуум от 10^{-3} до 10^{-6} Па. Сигнал, отвечающий иону, представлен несколькими пиками, соответствующими статистическому распределению различных изотопов этого иона. Такой сигнал называется *изотопным профилем* (для небольших молекул), а отдельный пик, представляющий наиболее распространенный изотоп для атома, – *моноизотопным пиком*. Результирующий масс-спектр является графиком зависимости количества различных ионов от отношения *m/z*. При анализе сложных молекул возникает необходимость в двух и более последовательных масс-анализаторах для расшифровки молекулярной

структуры. В приборе МС/МС (MS^n) (*тандемный масс-спектрометр*) масс-анализаторы выстраивают последовательно друг за другом. Из ионов, разделенных в первом масс-анализаторе, отбирают неидентифицированные по своему строению частицы (*родительские ионы*) и разбивают их на более мелкие фрагменты столкновением с атомами инертного газа (*диссоциация, активированная соударением,* – CID) или лазерным излучением. Этот процесс реализуется перед вторым масс-анализатором, при помощи которого анализируют продукты распада (*дочерние ионы)*.

Масс-спектрометрический анализ дает важную качественную и количественную (с использованием внешнего или внутреннего стандартов) информацию (определение молекулярных масс, структуры фрагментов определяемых молекул) с пределом обнаружения от пикомоль [пмоль (10^{-12})] до фемтомоль [фмоль (10^{-15})].

Разновидности метода отличаются способом ввода образца в прибор, механизмом образования ионов (типом *ионного источника*) и способом разделения ионов по отношению массы к заряду (типом *масс-анализатора*).

Технические характеристики масс-спектрометров

Важнейшими техническими характеристиками масс-спектрометров являются скорость сканирования, чувствительность, динамический диапазон, разрешение.

Скорость сканирования

Масс-анализатор пропускает ионы с определенным соотношением массы и заряда (*m/z*) в определенное время (кроме многоколлекторных приборов, ионно-циклотронного резонанса, орбитальной ловушки ионов). Для того чтобы проанализировать все ионы по отношению *m/z*, масс-анализатор должен сканировать все значения, нужные для пропускания к детектору всех интересующих ионов. Скорость развертывания поля называется скоростью сканирования, которая должна быть максимальна (соответственно, время сканирования должно быть как можно меньше), поскольку масс-спектрометр должен зарегистрировать сигнал за время

выхода хроматографического пика, которое может составлять несколько секунд. При этом чем больше масс-спектров будет измерено за время выхода хроматографического пика, тем точнее будет описан хроматографический пик, и тем меньше будет вероятность пропустить его максимальное значение.

Самым медленным масс-анализатором является магнит, минимальное время сканирования которого, без особой потери чувствительности, составляет доли секунды. Квадрупольный масс-анализатор может разворачивать спектр за десятые доли секунды, ионная ловушка и линейная ионная ловушка – быстрее, а масс-спектрометр ионно-циклотронного резонанса – медленнее.

Любое сканирование во всех перечисленных типах масс-анализаторов является компромиссным – с увеличением скорости сканирования понижается чувствительность, т.к. меньше времени тратится на запись сигнала на каждое массовое число. Для типичных методов анализа скорости сканирования квадрупольного анализатора или ионной ловушки оказывается достаточно для получения удовлетворительных результатов. В то же время для высокопроизводительного анализа сложных молекулярных систем желательно использовать времяпролетный масс-спектрометр, который способен записывать масс-спектры со скоростью 40000 спектров в секунду.

Разрешение

Разрешение или разрешающая способность масс-спектрометра определяется как возможность масс-анализатора разделять ионы с близкими массами. Очень важно определить массы ионов максимально точно, это позволяет вычислить атомный состав иона или идентифицировать молекулу путем сравнения с базой данных, сократив число возможных кандидатов с тысяч и сотен до единиц или одного единственного. Для магнитных масс-анализаторов, в которых расстояние между пиками масс-спектра не зависит от масс ионов, разрешение представляет собой величину равную $M/\Delta M$. Эта величина, как правило, определяется по 10 %-й высоте пика. Таким образом

разрешение 1000 означает, что пики с массами 100,0 а.е.м. и 100,1 а.е.м. отделяются друг от друга, то есть не накладываются вплоть до 10 % высоты.

Для анализаторов, в которых расстояние между пиками меняется в рабочем диапазоне масс (чем больше масса, тем меньше расстояние), таких как квадрупольные анализаторы, ионные ловушки, времяпролетные анализаторы, разрешение (M/ΔM) имеет другой смысл: оно характеризует конкретную массу. Поэтому эти масс-анализаторы характеризуют по ширине пиков – величине, остающейся постоянной во всем диапазоне масс. Ширина пиков измеряется на уровне 50 % их высоты. Для таких приборов ширина пика на полувысоте, равная 1, является неплохим показателем и означает, что такой масс-анализатор способен различить номинальные массы, отличающиеся на атомную единицу массы практически во всем его рабочем диапазоне.

Номинальной массой или массовым числом называют ближайшее к точной массе иона целое число в шкале атомных единиц массы. Например, масса иона водорода H^+ равна 1,00787 а.е.м., а его массовое число равно 1. Масс-анализаторы, которые измеряют номинальные массы, называют анализаторами низкого разрешения. Масс-спектрометры с двойной фокусировкой (магнитной и электростатической), ионно-циклотронного резонанса относятся к приборам среднего или высокого разрешения. Типичным разрешением для магнитного спектрометра является величина, превышающая 60000, а работа на уровне разрешения 10000 – 20000 является рутинной. На масс-спектрометре ионно-циклотронного резонанса при анализе образца с массой около 500 а.е.м. можно легко достичь разрешения 500000, что позволяет проводить измерения масс ионов с точностью до четвертого – пятого знака после запятой. Разрешения в несколько тысяч можно добиться при использовании времяпролетных масс-анализаторов; однако, исследуя образцы с большой молекулярной массой, для которых этот тип приборов имеет преимущество перед другими анализаторами, этого

разрешения хватает лишь для того, чтобы измерить массу иона с точностью ± десятки а.е.м.

Разрешение масс-анализатора тесно связано с другой важной характеристикой – точностью измерения массы иона. Например, массы молекулярных ионов азота (N_2^+) и углерода монооксида (CO^+) составляют 28,00615 и 27,99491 а.е.м. соответственно, оба иона характеризуются массовым числом 28. Эти ионы будут регистрироваться масс-спектрометром порознь при разрешении 2500, а измеренное точное значение массы покажет, какой из этих газов регистрируется. Измерение точной массы доступно на приборах с двойной фокусировкой, на времяпролетных масс-спектрометрах (в низкомолекулярном диапазоне) и на масс-спектрометрах ионно-циклотронного резонанса.

Динамический диапазон

Динамический диапазон – соотношение максимального и минимального детектируемых сигналов. При анализе смеси, содержащей 99,99 % одного соединения или какого-либо элемента и 0,01 % какой-либо примеси, диапазон линейности должен быть четвертого порядка. Масс-спектрометры для анализа органических соединений характеризуются динамическим диапазоном в 5 – 6 порядков, а масс-спектрометры для элементного анализа – 9 – 12 порядков.

Чувствительность

Чувствительность является одной из важнейших характеристик аналитических приборов. Обычно рассматривают связанный с чувствительностью параметр – минимальное определяемое количество вещества или порог обнаружения. Типичная величина порога обнаружения хорошего хроматомасс-спектрометра, используемого для анализа органических соединений, составляет $1 \cdot 10^{-12}$ г при вводе 1 микролитра раствора.

Пределы обнаружения неорганических веществ методом ICP/MS (ИСП/МС – масс-спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой) составляют $1 \cdot 10^{-15}$ (одна доля на квадриллион).

Область применения метода

Установление подлинности лекарственных веществ

Фрагментированный масс-спектр является «отпечатком пальцев» химического строения. Поэтому идентичность масс-спектров однозначно свидетельствует об идентичности молекул, особенно в сочетании с использованием библиотек масс-спектров и хроматографических данных. Масс-спектр высокого разрешения позволяет определять атомный состав молекулы (брутто-формулу) по точной массе.

Количественное определение фармацевтических субстанций и примесей в лекарственных формах

Количественный анализ проводится с использованием стандартных образцов в комбинации с традиционными хроматографическими методиками, причем не требуется точного воспроизведения условий хроматографирования, поскольку пик на хроматограмме идентифицируют по масс-спектру, а интегрирование по площадям пиков избранных ионов или пиков избранных реакций образования конкретного иона, как правило, позволяет количественно определять компонент при неполном разделении пиков на хроматограмме.

Идентификация примесей и установление неизвестной структуры

Масс-спектр позволяет определить молекулярную массу соединения по молекулярному иону, а во многих случаях выяснить, из каких фрагментов состоит молекула, что в сочетании с применением библиотек спектров и данными спектроскопии ЯМР дает возможность однозначно установить химическую структуру.

Количественное определение следовых количеств веществ в фармакокинетике и метаболомике. Избирательность в режимах SIM

(мониторинг избранных ионов) и SRM (мониторинг избранных реакций) наряду с очень высокой чувствительностью позволяет использовать комбинацию ВЭЖХ и масс-спектрометрию для определения анализируемых веществ на фоне таких сложных многокомпонентных смесей, как биологические жидкости или растительные экстракты.

Количественное определение более 70 элементов с пределами измерения от 10 до 0,1 ppt (parts per trillion) методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой.

Оборудование. Масс-спектрометр состоит из следующих блоков, имеющих несколько разновидностей: системы ввода образца, ионного источника, масс-анализатора, детектора и системы обработки данных.

Система ввода образца.

Первой стадией анализа является ввод образца испытуемого вещества в прибор без существенного нарушения вакуума.

Наиболее применимы системы ввода, позволяющие анализировать компоненты смеси, разделяемые при помощи соответствующего прибора, соединенного с масс-спектрометром.

Газовая хроматография/масс-спектрометрия (ГХ/МС) (GC/MS).

При использовании подходящих капиллярных колонок возможно непосредственное введение конца колонки в ионный источник прибора без применения сепаратора.

Применяется для анализа химических соединений, имеющих температуру кипения примерно до 400 ºС.

Жидкостная хроматография/масс-спектрометрия (ЖХ/МС) (LC/MS) .

Такая комбинация приборов особенно эффективна при анализе нелетучих полярных соединений либо термолабильных веществ. В связи с трудностью получения ионов в газовой фазе при данном методе требуется применение специальных интерфейсов: электроспрей (ESI), термоспрей (TSI), химическая ионизация при атмосферном давлении (APCI),

фотоионизация при атмосферном давлении (APPI) и др., которые представляют собой самостоятельные методы ионизации и будут рассмотрены ниже.

Сверхкритическая флюидная хроматография/масс-спектрометрия

Этот метод ввода образца заключается в том, что подвижная фаза, обычно состоящая из находящегося в сверхкритическом состоянии углерода диоксида, переходит в газообразное состояние после прохождения через нагретую заслонку, находящуюся между колонкой и ионным источником.

Капиллярный электрофорез/масс-спектрометрия (CE/MS)

Элюент вводится в ионный источник, в некоторых случаях после добавления дополнительного растворителя, при этом скорость потока может достигать нескольких миллилитров в минуту. Ограничениями данного метода являются малые количества вводимого образца и необходимость использовать летучие буферные растворы.

Устройства для прямого ввода образца

Образец вводится в прибор через вакуумный шлюз при помощи клапана, штанги, транспортера или автосамплера, испаряется термически или в процессе десорбции с поверхности непосредственно в ионном источнике. При таком способе ввода необходимо использовать чистые образцы или иметь в виду, что полученный масс-спектр может представлять собой спектр смеси нескольких соединений.

Ионный источник

Электронная ионизация (EI). Образец испытуемого вещества, находящийся в газообразном состоянии, ионизируют потоком электронов, энергия которых (обычно 70 эВ) больше энергии ионизации образца. При этом, кроме молекулярного иона M^+, образуются осколочные ионы меньшей массы, характерные для данной молекулярной структуры. Главным ограничением данного способа является необходимость испарения образца, что делает невозможным исследование полярных, термолабильных или высокомолекулярных соединений. Электронная ионизация может быть

использована в газовой хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией и лишь в отдельных случаях – в жидкостной хроматографии.

Химическая ионизация (CI). При этом способе ионизации используется газ-реагент (метан, изобутан, аммиак, азота монооксид, азота диоксид или кислород). В спектре присутствуют ионы типа $(M+H)^+$, $(M–H)^-$, а также ионные комплексы, образованные аналитом с используемым газом-реагентом. Фрагментация при химической ионизации проявляется в меньшей степени, чем при ионизации электронным ударом.

Для термолабильных веществ используют разновидность данного метода ионизации, при которой образец, нанесенный на проволоку, очень быстро испаряется вследствие эффекта Джоуля – Томсона (десорбционная химическая ионизация).

Бомбардировка быстрыми атомами (FAB) или ионизация бомбардировкой быстрыми ионами (вторично-ионная масс-спектрометрия – SIMS). Образец, растворенный в вязкой матрице (глицерин или *м*-нитробензиловый спирт), наносят на металлическую поверхность, ионизируют потоком нейтральных атомов (аргон или ксенон) или обладающими большой кинетической энергией ионами цезия. Наблюдаются ионы $(M+H)^+$ и $(M–H)^-$ типов или ионные комплексы, образованные средой (матрицей) и образцом. Данный тип ионизации хорошо подходит для полярных, термолабильных соединений, позволяя получать спектры молекул с массой до 10000 Да. Важно, чтобы образец был равномерно распределен в матрице, в противном случае качество спектра сильно ухудшается, а попытки количественного анализа смесей приводят к непредсказуемым результатам. Известен проточный вариант FAB, который может быть использован для жидкостной хроматографии, однако скорость потока подвижной фазы должна быть очень низкой (менее 10 мкл/мин).

Полевая десорбция и полевая ионизация. Образец испаряют около вольфрамового проволочного эмиттера, покрытого микроиглами *(полевая ионизация)* или помещают на эту проволоку *(полевая десорбция)*.

Электрическое поле (напряжение около 10 кВ), образуемое эмиттером, ионизирует образец. Энергия, переносимая при данных способах ионизации, составляет всего доли эВ, т.е. избыточная энергия молекулярного иона значительно ниже, чем при других способах ионизации. Кроме того, другие электроны ионизирующейся молекулы не возбуждаются, и M+ оказывается в основном (невозбужденном) электронном состоянии, и спектр зачастую представляет собой единственный пик, принадлежащий молекулярному иону.

Матричная лазерная десорбционная ионизация (MALDI). Образец, смешанный с соответствующей средой (матрицей) и помещенный на металлическую подложку, ионизируют короткими лазерными импульсами с длиной волны от УФ- до ИК-диапазона (продолжительность импульсов может составлять от пикосекунды до нескольких наносекунд). В качестве матрицы обычно используются УФ-поглощающие органические соединения (2,5-дигидроксибензойная, синаповая кислоты, 2,6-дигидроксиацетофенон и др.). Данный способ ионизации применяется, главным образом, при анализе соединений с очень большой молекулярной массой (более 100000 Да).

Индуктивно связанная плазма (ICP). Образец, растворенный в сильной минеральной кислоте (азотная кислота, хлористоводородная кислота, плавиковая кислота, царская водка и т.д.), подается в зону горения аргоновой плазмы, где при температуре в несколько тысяч градусов происходит распад образца на атомы с ионизацией. Метод применяется для определения более 70 элементов. Ввиду наличия молекулярных интерференций оптимально использовать приборы высокого разрешения или комбинированные масс-анализаторы с камерой соударений. Изотопные интерференции, как правило, могут быть разрешены математическими методами.

Электроспрей (электрораспыление) (ESI). Образец, находящийся в растворе, вводится в источник через капилляр, на конце которого имеется потенциал порядка 5 кВ. На выходе из капилляра образуется аэрозоль из

заряженных капель с высоким поверхностным зарядом. Испарение молекул растворителя из образующихся микрокапель приводит к образованию в газовой фазе однозарядных $(M+H)^+$, $(M–H)^-$ или многозарядных ионов $(M+nH)^{+n}$, $(M–nH)^{-n}$. Скорость потока подвижной фазы при данном виде ионизации может меняться от нескольких нл/мин до 1 – 2 мл/мин. Такой способ ионизации применяют для полярных соединений. Использование электроспрея особенно эффективно для установления структуры полипептидов, белков и нуклеиновых кислот с молекулярными массами до 1000000 Да и выше. Очень хорошо электроспрей сочетается с жидкостной хроматографией и капиллярным электрофорезом.

Химическая ионизация при атмосферном давлении (APCI). Ионизацию образца проводят при атмосферном давлении в зоне коронного разряда, помещенной на пути подвижной фазы, которая распыляется как вследствие тепловых эффектов, так и благодаря использованию потока азота. Образуются однозарядные ионы $(M+H)^+$ или $(M–H)^-$. Метод хорошо зарекомендовал себя для анализа сравнительно небольших полярных и неполярных молекул с массой менее 1200 Да. Возможность использования высоких скоростей потока подвижной фазы (до 2 мл/мин) делает этот способ ионизации идеальным для сочетания с жидкостной хроматографией.

Фотоионизация при атмосферном давлении (APPI). В ионном источнике APPI используют криптоновую лампу, которая излучает фотоны с энергией 10,0 и 10,6 эВ. Эти фотонные энергии достаточны для ионизации большинства анализируемых соединений, в то время как для ионизации типичных растворителей (вода, метанол, ацетонитрил и т.д.) для обращенно-фазовой жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием необходимо излучение с большей энергией. Использование низкоэнергетичных фотонов в качестве источника ионизации приводит к получению масс-спектров, свободных от «химического шума», а также гарантирует минимальную фрагментацию ионов, позволяя идентифицировать протонированные ионы или радикальные катионы.

Кроме перечисленных разновидностей ионных источников существует целый ряд менее распространенных способов ионизации, таких как термоспрей, плазменная десорбция, лазерная абляция и др.

Масс-спектрометрия DART

Масс-спектрометрия DART (Direct Analysis in Real Time) – быстрый метод получения спектров низкомолекулярных соединений в режиме on-line непосредственно во время анализа, практически не требующий пробоподготовки. Метод позволяет проводить сверхбыструю идентификацию компонентов любых твердых или жидких объектов. Процедура анализа сводится к тому, что объект вносят пинцетом (в случае твердых образцов) или палочкой (в случае жидких объектов) в ионный источник DART, где происходит испарение вещества и его ионизация с последующей регистрацией ионов масс-спектрометром. При этом образуются очень простые спектры, обычно содержащие протонированные молекулярные ионы низкомолекулярных компонентов пробы. Метод масс-спектрометрии DART применим для отслеживания полноты протекания реакций органического синтеза новых лекарственных веществ, прямого анализа компонентов смесей, разделенных на пластинке ТСХ, с ее поверхности, обнаружение фальсификатов при анализе фармацевтических субстанций и лекарственных препаратов.

Масс-анализатор

Двойная фокусировка

Принцип действия всех масс-анализаторов основан на физических законах движения заряженных частиц, согласно которым траектория заряженных частиц в магнитном поле искривляется, а радиус кривизны зависит от массы частиц. Именно в регистрирующем устройстве ионы распределяются по массам. Для увеличения разрешения на пути ионов устанавливают дополнительно электростатический анализатор. Магнитные масс-спектрометры имеют высокое разрешение, что позволяет использовать их при исследовании органических соединений с высоким разрешением, при

анализе изотопных соотношений, элементном анализе на предельной чувствительности.

Квадрупольный анализатор

Устройство анализатора указанного типа основано на принципе квадруполя, который представляет собой 4 стержня, на которые попарно в противоположной полярности подается определенная комбинация постоянного и радиочастотного переменного электрического напряжения. Ионы, перемещающиеся параллельно осям этих стержней, попадают в гиперболическое поле. Возможность пропускания ионов зависит от соотношения *m/z* и напряжения радиочастотного поля. Изменяя напряжение поля сканируют все значения *m/z* в рабочем диапазоне прибора (обычно от 1 до 2000). Некоторые приборы сканируют до 4000 а.е.м.

Квадрупольные масс-спектрометры не требуют использования высоких напряжений порядка тысячи вольт, в отличие от магнитных масс-спектрометров. Это позволяет упростить конструкцию, поскольку для создания вакуума в приборе требуются меньшие размеры вакуумной камеры.

Времяпролетный анализатор (Time of Flight, TOF)

В таких анализаторах ионы распределяются по массе в бесполевом пространстве, а не за счет закономерностей движения заряженных частиц в поле (магнитном или электростатическом). Ионы из источника разгоняются электрическим полем, приобретая достаточно большую кинетическую энергию, и попадают в бесполевое пространство. На входе в это пространство все ионы имеют одинаковую кинетическую энергию и, в соответствии с формулой $E = mv^2/2$, будут двигаться с разными скоростями. В зависимости от массы ионы в разное время достигнут детектора. Регистрация ионов и измерение времени при попадании в детектор позволяет рассчитать их массу.

На основе времяпролетного масс-анализатора сконструированы очень быстрые (и чувствительные) масс-спектрометры.

Времяпролетный масс-анализатор, в отличие квадрупольного анализатора, позволяет регистрировать широкий диапазон масс и измерять массы очень больших молекул, а наиболее подходящим способом ионизации оказался описанный выше метод MALDI (ионизация лазерной десорбцией при содействии матрицы).

Времяпролетные масс-анализаторы используют, в основном, благодаря их простоте, быстродействию и относительно невысокой стоимости.

Квадрупольная ионная ловушка

Развитие квадрупольных анализаторов привело к созданию «ионной ловушки».

В квадрупольной ионной ловушке ионы фиксируются внутри квадруполя за счет запирающих потенциалов на входном и выходном концах ловушки. Затем при наложении изменяемой резонансной радиочастоты ионы выводятся из ловушки в соответствии с величиной *m/z* и регистрируются электронным умножителем. Такой механизм позволяет значительно увеличить популяцию захваченных ловушкой ионов, что ведет к расширению динамического диапазона и к улучшению чувствительности.

Ионная ловушка позволяет удерживать ионы, которые необходимы для установления строения, не акцентируясь на остальных фрагментах молекулы, при этом процесс фрагментации можно повторять многократно, до 10 – 15 раз (общепринятое обозначение MS^n).

Ионно-циклотронный резонанс

Ионы, подвергнутые действию сильного магнитного поля, движутся по круговым траекториям с частотами, которые могут быть непосредственно связаны с величинами *m/z* для этих ионов посредством Фурье-преобразования. Анализаторы такого типа обладают очень высокой разрешающей способностью (до 1000000 и выше), а также позволяют получать MC^n спектры.

Недостатком масс-анализаторов на основе ионно-циклотронного резонанса является необходимость использования очень низкого давления

(порядка 10^{-7} Па) и применение сверхпроводящих магнитов, работающих при температуре жидкого гелия 4,2 К.

Орбитальная ловушка ионов

В орбитальной ловушке ионов (Orbitrap) не используют магнитные поля (масс-спектрометр с двойной фокусировкой или ионно-циклотронного резонанса) или радиочастоты (квадрупольные ионные ловушки). Принцип работы масс-анализаторов этого типа основан на электростатической аксиально-гармонической орбитальной ловушке ионов, которая использует симметричное статическое электрическое поле между внешним и внутренним электродами специальной формы.

По аналогии с масс-анализаторами на основе ионно-циклотронного резонанса в спектрометре с орбитальной ионной ловушкой ион детектируют по наведенному значению тока на внешних электродах; частоты, соответствующие различным *m/z*, выделяют с помощью алгоритма Фурье-преобразования, а затем конвертируют в масс-спектр.

Орбитальная ловушка характеризуется также большей емкостью ионов. Большая емкость пространственного заряда по сравнению с ионно-циклотронной и квадрупольной ловушками позволяет достичь большей точности измерения массы (разрешение порядка 100000 на полувысоте пика), более широкого динамического диапазона и диапазона отношений величин *m/z*.

Обнаружение сигнала и обработка данных

Ионы, разделенные анализатором, преобразуются в электрические сигналы детектирующими системами, в частности, электронным умножителем, фотоумножителем или цилиндром Фарадея. Контроль различных физических параметров, требуемых для согласованной работы всех систем прибора, обработка данных, включая калибровку, визуализацию спектров, автоматические количественные расчеты, архивирование данных, создание и использование библиотек масс-спектров, осуществляются компьютером с соответствующим программным обеспечением.

Регистрация спектров

Различают три основных способа регистрации спектров: по полному ионному току (TIC); мониторинг избранного иона (SIM) или нескольких ионов (MIM); селективная регистрация избранных реакций распада иона (SRM) или нескольких ионов (MRM).

Регистрация по полному ионному току и по диссоциации, инициированной соударением, позволяют получать масс-спектры, однозначно связанные со строением конкретной молекулы.

На основе полученных таким образом спектров созданы библиотеки (базы данных), позволяющие определять структуру молекулы по эталонным спектрам.

Селективная регистрация ионов позволяет определять малые концентрации аналита на фоне сложной матрицы, а также приводит к огромному выигрышу в чувствительности: время, которое тратится на запись полного масс-спектра, при селективной регистрации используется для записи только одного или нескольких ионов.

Регистрация избранных реакций является еще более избирательным методом определения искомого соединения в сложной смеси.

Рамановская спектрометрия ОФС.1.2.1.1.0009.15

Рамановская спектрометрия является экспрессным (1 – 2 с) и неразрушающим аналитическим методом идентификации и контроля качества лекарственных средств, поскольку дает возможность получить индивидуальный спектр молекулы вещества.

К преимуществам Рамановской спектрометрии следует отнести: возможность бесконтактного анализа твердых, жидких и газообразных веществ; метод не требует большого количества вещества (около 50 мг); анализ проводится без разрушения образца; кроме того, метод позволяет анализировать вещества в стеклянной и пластиковой упаковке.

Рамановская спектрометрия может быть использована для анализа таких физических свойств, как кристалличность, фазовые переходы и полиморфные состояния.

Метод. Рамановский спектр (он же спектр комбинационного рассеяния) возникает при облучении вещества монохроматическим лазерным излучением ультрафиолетового или видимого диапазона (диапазон длин волн от ультрафиолетовой до ближней инфракрасной области). Под действием излучения молекулы вещества поляризуются и рассеивают свет в интервале от 2 до 4000 $см^{-1}$. Если взаимодействие кванта падающего излучения с молекулой, находящейся в основном или возбужденном колебательном состоянии, является упругим, то энергетическое состояние молекулы не меняется, и частота рассеянного

излучения будет такая же, как падающего (релеевская полоса Рамановского спектра). В случае неупругого взаимодействия происходит обмен энергией между квантом излучения и молекулой, за счет чего возникает рассеянное излучение, которое может быть большей или меньшей частоты (антистоксова и стоксова полоса соответственно). Таким образом, формируется Рамановский спектр.

Спектры комбинационного рассеяния очень чувствительны к природе химических связей – как в органических молекулах и полимерных материалах, так и в кристаллических решетках и кластерах, что обуславливает индивидуальность спектра конкретного вещества. Спектры комбинационного рассеяния органических материалов в основном состоят из линий, отвечающих деформационным и валентным колебаниям химических связей углерода с водородом, кислородом и азотом, а также характеристическим колебаниям различных малополярных функциональных групп: связей C–C, C=C и C≡C, а также гидроксильной –OH, аминогруппы – NH_2 и т.д. Эти линии проявляются в диапазоне от 600 $см^{-1}$ (валентные колебания одинарных C–C связей) до 3600 $см^{-1}$ (колебания –OH группы). Кроме того, в спектрах ряда органических соединений в диапазоне 250 – 400 $см^{-1}$ проявляются деформационные колебания алифатических цепочек.

В результате анализа можно идентифицировать молекулярные фрагменты – определять строение вещества или изучать внутримолекулярные взаимодействия, наблюдая положение и интенсивность полос в Рамановском спектре. При этом достаточно просто идентифицировать фрагменты, используя поиск по библиотекам спектров.

Пробоподготовка при проведении исследования методом Рамановской спектрометрии не требуется, что позволяет значительно ускорить идентификацию и контроль качества лекарственных средств.

Прибор. Рамановские спектрометры основаны на одном из двух способов получения спектров: дисперсионная Рамановская спектрометрия

или Рамановская спектрометрия с Фурье преобразованием. Каждый из способов имеет свои преимущества для выполнения определенных задач.

Дисперсионный Рамановский спектрометр. В дисперсионном Рамановском спектрометре обычно используют лазеры в видимой области. Типичные длины волн лазеров 780, 633, 532 и 483 нм. Одним из преимуществ использования более коротковолновых лазеров является увеличение Рамановского сигнала, которое происходит при более коротких длинах волн.

Рассеянное Рамановское излучение фокусируется на дифракционной решетке, которая выделяет различные длины волн, фиксируемые на детекторе ПЗС (прибор с зарядовой связью), представляющем собой двумерную кремниевую матрицу светочувствительных элементов (пикселей).

Ограничением использования лазера с более короткой длиной волны для получения усиленного Рамановского сигнала от образца является флуоресцентное излучение, превышающее Рамановский сигнал при облучении образца коротковолновым лазером.

Фурье-Рамановский спектрометр. Рамановская спектрометрия с Фурье преобразованием позволяет устранить проблемы с флуоресценцией образцов, которая характерна для дисперсионной Рамановской спектрометрии.

Фурье-Рамановские спектрометры используют возбуждающий лазер 1 мкм, интерферометр и высокочувствительный детектор в ближнем инфракрасном диапазоне. При использовании возбуждающего лазера с большей длиной волны снижается энергия облучения, поэтому уменьшается вероятность наложения высоких электронных уровней, что значительно снижает вероятность возникновения флуоресценции. В Рамановской спектрометрии с Фурье преобразованием используют чувствительные детекторы – InGaAs или охлаждаемый жидким азотом Ge-детектор, которые посредством Фурье-трансформаций превращают сигналы в набор частот или волновых чисел.

Идентификация и количественное определение с использованием стандартного образца

Идентификация соединения по спектру комбинационного рассеяния осуществляется сравнением его спектра со спектром стандартного образца, зарегистрированных на одном и том же приборе в одних и тех же условиях. Количественное определение проводят с использованием известных количеств или концентраций стандартного образца.

Количественный анализ основан на прямо пропорциональной зависимости интенсивности (I) линий спектра числу молекул (N) в единице объема:

$$I = i \cdot k \cdot N ,$$

где i – интенсивность рассеиваемого света на одну молекулу;

k – коэффициент, зависящий от условий эксперимента, постоянная для данного прибора величина.

При количественном анализе смеси проводится последовательная регистрация спектров в одинаковых условиях и сравнение интенсивностей линий образцов, с учетом предварительной идентификации всех компонентов смеси и наличия соответствующих стандартов. Сравнение может быть осуществлено также по методу внутреннего стандарта при добавлении в анализируемую смесь определенного количества стандартного вещества.

Идентификация и количественное определение с использованием библиотек спектров

Количественное определение образца проводят также с использованием библиотек спектров сравнения и с учетом всех необходимых поправок и калибровок прибора.

Интенсивность в максимуме спектральной линии (I_0) выражают или в произвольной относительной шкале либо в условной, принимая в качестве эталона интенсивность линии образцов сравнения. Шкалу волновых чисел

проверяют по характерным максимумам стандартов: циклогексана (801,3 $см^{-1}$), индена (533,9 $см^{-1}$) или нафталина (513,8 $см^{-1}$).

Факторы, влияющие на абсолютную и относительную интенсивность спектральных полос:

– поляризация падающего света;
– поляризация собирательной оптической системы;
– интенсивность падающего света;
– различия в отклике прибора;
– различия в фокусе и геометрии образца.

При эксплуатации прибора допустимы колебания в относительных интенсивностях спектральных полос ± 10 %.

При анализе примесей в лекарственных средствах важно иметь программное обеспечение, включающее библиотеки спектров. Набор спектров, полученных на данном спектрометре и образующих спектральную библиотеку, содержит информацию, определяющую границы подобия или количественные пределы, которые могут быть применены при идентификации вещества и установлении его количественного состава. Использование библиотек позволяет провести качественный анализ состава лекарственного средства с определением пропорций содержания отдельных компонентов. Селективность базы данных, которая позволяет уверенно идентифицировать конкретное вещество или отличить его от других материалов базы данных, устанавливается при валидации.

Полученная таким образом спектральная библиотека пригодна только для использования данного прибора либо аналогичного при условии подтверждения достоверности работы библиотеки после переноса.

Рентгеновская флуоресцентная спектрометрия	**ОФС.1.2.1.1.0010.15** **Вводится впервые**

Рентгеновская флуоресцентная спектрометрия – метод анализа, используемый для определения концентраций элементов от бериллия (№ 4) до урана (№ 92) в диапазоне от долей ppm до 100 % в веществах и материалах различного происхождения. Погрешность рентгенофлуоресцентного анализа варьируется в пределах 0,2 – 3 %.

Метод

Метод основан на зависимости интенсивности рентгеновской флуоресценции от концентрации элемента в образце. При облучении образца потоком рентгеновского излучения возникает характеристическое флуоресцентное излучение, которое пропорционально концентрации элемента в образце. Излучение разлагается в спектр при помощи кристалл-анализаторов, далее с помощью детекторов и счетной электроники измеряется его интенсивность. Математическая обработка спектра позволяет проводить количественный и качественный анализ.

При облучении атомов образца фотонами с высокой энергией первичным рентгеновским излучением от рентгеновской трубки атомы переходят в возбужденное состояние, но спустя доли секунды возвращаются к стабильному (основному) состоянию.

Такой переход электронов сопровождается испусканием энергии в виде вторичного фотона с возникновением флуоресценции. Энергия вторичного фотона находится в диапазоне энергий рентгеновского

излучения, которое располагается в спектре электромагнитных колебаний между ультрафиолетом и гамма-излучением. Рентгенофлуоресцентный анализ охватывает следующие диапазоны энергий и длин волн:

$E =$ 0,11 – 60 кэВ, $\lambda =$ 11,30 – 0,02 нм.

Разница энергии между энергетическими уровнями и частота колебаний поглощенного кванта соотносятся между собой уравнением:

$$E = E_1 - E_2 = h\nu = hc/\lambda ,$$

где E_1 и E_2 – энергии орбиталей, между которыми произошел переход электрона, эВ;

h – постоянная Планка ($6{,}626 \cdot 10^{-34}$ Дж $\cdot$ с);

c – скорость света, с;

λ – длина волны, нм;

ν – частота испускаемого (вторичного) фотона.

Длина волны флуоресценции является индивидуальной характеристикой каждого элемента и называется характеристической флуоресценцией. В то же время интенсивность (число квантов, поступающих за единицу времени) пропорциональна концентрации (количеству атомов) соответствующего элемента. Это позволяет проводить количественный элементный анализ вещества.

В качестве единицы измерения **интенсивности** используется величина, равная числу рентгеновских квантов, измеренных за секунду, **имп/с** (количество импульсов за секунду) или **кимп/с** (количество килоимпульсов за секунду).

Существуют два метода регистрации рентгеновской флуоресценции: волнодисперсионная и энергодисперсионная.

Качественный анализ

При прохождении рентгеновского излучения через образец происходит ослабление его интенсивности. Степень ослабления зависит как от энергии излучения, так и от химического состава поглощающего образца.

Удельной характеристикой поглощения элемента является массовый коэффициент ослабления (μ_M), связанный с плотностью ρ [г/см^3] поглощающего материала и линейным коэффициентом поглощения μ [1/см]:

$$\mu_M = \mu/\rho$$

Коэффициент μ_M имеет размерность [см^2/г]. Он зависит лишь от атомного номера поглощающего элемента и от энергии поглощаемых рентгеновских квантов. Рассчитывают μ_M по справочным значениям массовых коэффициентов ослабления элементов по известной формуле исследуемого образца.

В случае неизвестного элементного состава измеряют интенсивность комптоновского рассеяния I_U и рассчитывают величину μ_M по уравнению:

$$\frac{1}{\mu_M} = a + bI_U ,$$

где a и b – угловые коэффициенты калибровочной кривой.

Количественный анализ

Для определения концентрации элемента в образце измеряют скорость счета для нескольких стандартных образцов, содержащих известные количества данного элемента в матрицах определенного состава, и рассчитывают или измеряют массовый коэффициент ослабления матрицы анализируемого образца.

Калибровка. С целью точной оценки состава образца необходимо установить зависимость между измеренной интенсивностью линии и концентрацией соответствующего элемента в образце.

При анализе водных растворов и сложных по составу образцов для калибровки применяют метод разбавления (прямой способ внешнего стандарта) добавлением к изучаемому образцу больших количеств слабого поглотителя или малых количеств сильного поглотителя. На графике зависимости $I_C^N = f(C_A)$ определяют наклон калибровочной кривой b_0 по уравнению:

$$b_0 \frac{1}{\mu_M} = \frac{I_C^N}{C},$$

где μ_M – рассчитанный или измеренный массовый коэффициент ослабления матрицы *M;*

I_C^N – суммарная интенсивность;

C – концентрация определяемого элемента в образце.

Определение суммарной интенсивности элемента в образце. Интенсивность флуоресценции, например, K_α-линии элемента, ($N_{K\alpha}$) пропорциональна числу квантов, поглощенных *K*-уровнем, и выходу флуоресценции для *K*-серии.

Рассчитывают суммарную интенсивность излучения (I_C^N) определяемого элемента по измеренным интенсивностям флуоресцентной и фоновой линий, в предположении наличия в образце посторонних примесей.

Определение следовых количеств элемента. Для разбавленных растворов, если концентрация элемента находится в линейной части калибровочной кривой, методом рентгенофлуоресцентного анализа можно рассчитать концентрацию (*C*) по уравнению:

$$C = \frac{I_C^N}{b_0 \frac{1}{\mu_M}} \cdot f,$$

где f – коэффициент разбавления.

Оборудование

Приборы рентгенофлуоресцентного анализа состоят из рентгеновского источника, держателя пробы и спектрометра. Спектрометр измеряет длину волны (λ) или энергию (*E*) и интенсивность флуоресцентного излучения, испускаемого пробой. В зависимости от параметра, непосредственно измеряемого спектрометром (λ или *E*), различают приборы с волновой и энергетической дисперсией, устройство которых принципиально различно.

Рентгеновские источники, используемые для возбуждения атомов в пробе, как правило, не имеют принципиальных отличий в приборах с

волновой и энергетической дисперсией. Наиболее широко используемым источником первичного рентгеновского излучения являются рентгеновские трубки.

Волнодисперсионные спектрометры. Для разложения излучения в спектр (выделения различных длин волн) в волнодисперсионном методе используют разные кристаллы-анализаторы с кристаллическими плоскостями, параллельными поверхности и имеющими межплоскостное расстояние *d*. Для волнодисперсионных спектрометров существуют разные типы детекторов. Для относительно больших длин волн при анализе легких элементов используются газонаполненные пропорциональные детекторы (проточные и запаянные). Их действие основано на ионизации газа излучением и измерении числа электрических импульсов, прошедших через ионизированный газ. Для коротких длин волн (соответствуют тяжелым элементам) применяются сцинтилляционные детекторы, в которых измеряется ток фотоэлемента, чувствительного к светимости специального вещества – сцинтиллятора (NaI/Tl) при попадании на него рентгеновского излучения. Количество регистрируемых импульсов прямо пропорционально содержанию элемента в пробе. Многоэлементный анализ для фиксированного набора элементов на спектрометре с волновой дисперсией можно выполнить за несколько минут.

Энергодисперсионные спектрометры. В энергодисперсионных спектрометрах диапазон энергий вторичного (характеристического) излучения от пробы регистрируется в один этап. Спектр представляет зависимость интенсивности пиков от энергий излучения элементов. Выделенное излучение поступает в детектор рентгеновского излучения для измерения его интенсивности. Детектирование флуоресцентного излучения основано на преобразовании энергии квантов флуоресцентного излучения в импульсы напряжения определенной амплитуды. Для детектирования флуоресцентного излучения используются полупроводниковые твердотельные детекторы, действие которых основано на ионизации внутри

полупроводника. Полупроводниковый детектор изготавливается из Si или Ge.

Энергодисперсионный метод обладает крайне высокой чувствительностью и экспрессностью, что позволяет определять в образцах элементы от натрия (Na) до урана (U), получать рентгенограммы в проходящих лучах, проводить двумерное и трехмерное картирование образцов по содержанию тех или иных элементов.

Пробоподготовка

Для уменьшения ошибки анализа, связанной с пробоподготовкой, образцы должны быть гомогенизированы.

Твердые образцы подготавливают следующим образом:

а) тщательно растирают стандарт и образцы в ступке по отдельности;

б) берут одинаковые навески.

Для уменьшения эффектов поглощения и возбуждения, искривляющих калибровочные графики, анализируемую пробу разбавляют прозрачным для рентгеновских лучей веществом (полистирол, борная кислота, крахмал, алюминия гидроксид, вода и т.д.). Степень разбавления определяют экспериментально. Порошкообразную пробу с равномерно распределённым разбавителем и внутренним стандартом брикетируют или растворяют. Толщина брикета (таблетки) должна быть достаточно большой (около 1 – 2 мм), чтобы интенсивность излучения образца не зависела от величины навески.

Если критическая толщина не достигнута, то интенсивность флуоресценции зависит от толщины образца, вследствие чего возникают ошибки измерения. Оценить критическую толщину образца можно по формуле:

$$d \approx 4{,}6/\mu(\lambda c),$$

где d – критическая толщина образца (см), ниже которой интенсивность флуоресценции зависит от толщины;

$\mu(\lambda c)$ – коэффициент ослабления образца для флуоресцентного излучения с длиной волны λc, $см^{-1}$.

Приготовленные брикеты (таблетки) пригодны для многократных измерений. Испытуемое вещество может быть помещено в виде порошка непосредственно в кюветы прибора. Порошок образца может быть помещён в держатель из плексигласа и запрессован под полимерной плёнкой или нанесён на клейкую плёнку.

Для уменьшения погрешности пробоподготовки следует прессовать образцы.

Рентгеновская порошковая дифрактометрия	**ОФС.1.2.1.1.0011.15** **Вводится впервые**

Рентгеновская порошковая дифрактометрия позволяет качественно и количественно определять различные фазы в их смеси на основе анализа дифракционной картины, создаваемой при облучении исследуемого образца рентгеновскими лучами.

Преимуществами данного метода являются высокая достоверность и экспрессность; метод – прямой, так как дает сведения непосредственно о структуре вещества; метод не требует большого количества вещества (не более 0,1 г); анализ можно проводить без разрушения образца; метод позволяет оценить количество фаз в смеси.

МЕТОД

К рентгеновским лучам относят излучение, занимающее участок электромагнитного спектра от нескольких сотен до десятых долей ангстрема (Å) (1 Å = 0,1 нм). Расстояние между атомами в кристаллической решетке твердых тел колеблется от единиц до полутора десятков ангстрем. Прохождение рентгеновских лучей через вещество сопровождается разными видами взаимодействия, одним из которых является рассеяние рентгеновских лучей. Вещество, которое подвергается действию рентгеновского излучения, испускает вторичное излучение, длина волны которого равна длине волны падающих лучей (когерентное рассеяние). Каждый изолированный атом рассеивает излучение равномерно во все стороны в виде концентрических сфер. Если падающая волна рентгеновского излучения перпендикулярна

атомному ряду, то все атомы ряда одновременно излучают электромагнитные колебания. Поскольку расстояние между атомами соизмеримо с длиной волны вторичного когерентного излучения, то кристалл может служить для него дифракционной решеткой. Энергия этого излучения рассеивается в разных направлениях с различной интенсивностью: по одним направлениям усиливается, по другим – ослабляется и даже полностью гасится. Усиление колебаний происходит по тем направлениям, где разность хода рентгеновских лучей равна целому числу волн или четному числу полуволн. Это правило (условие интерференции) справедливо для любого излучения. В результате образуется серия плоских волн, которые распространяются в особых направлениях. Дифрагированный луч можно рассматривать как результат отражения от одной из плоскостей атомной решетки. Любая трехмерная решетка рассматривается как совокупность бесконечного числа параллельных атомных плоскостей, расположенных на равном расстоянии друг от друга. Отражение лучей будет происходить не только от внешней поверхности, а от всех атомных плоскостей (их серий), так как рентгеновский луч, в отличие от оптического излучения, проникает вглубь кристалла.

Серия плоскостей характеризуется межплоскостным расстоянием d (рис. 1). Каждая плоскость отражает луч под одним и тем же углом, так как рентгеновские лучи распространяются в веществе практически без преломления. При отражении лучи могут интерферировать в том случае, если их разность хода (AOB) будет равна целому числу волн Δ (AOB) = $n\lambda$; AOB = $2d \cdot \sin\theta$.

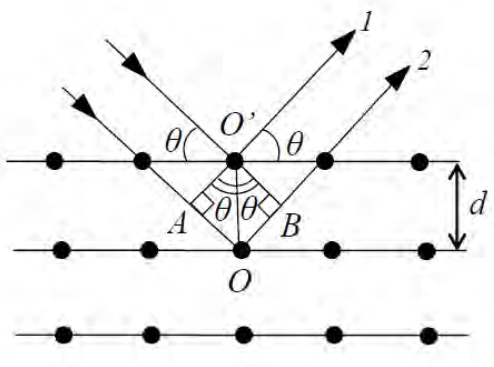


Рисунок 1 – Иллюстрация отражения лучей от серии плоскостей атомной решетки

Условие дифракции рентгеновских лучей (уравнение Вульфа – Брэгга) имеет вид:

$$2d \cdot \sin \theta = n\lambda,$$

где n – порядок отражения (n = 1, 2, 3).

При выполнении условия Вульфа – Брэгга рентгеновский луч регистрируется детектором или на фотопленке. Интенсивность максимума зарегистрированного луча зависит от количества и типов атомов, составляющих данное семейство плоскостей, то есть от "заселенности" атомной плоскости. Поэтому интенсивность отраженного луча также является характеристикой изучаемого объекта.

Широкое распространение из-за простоты и универсальности получил метод порошка (метод Дебая – Шеррера), когда монохроматический пучок рентгеновских лучей направляют на поликристаллический образец. Так как кристаллы, из которых состоит образец, очень малы (микрокристаллы), то в исследуемом объеме образца их оказываются десятки миллионов. Отраженные разными микрокристаллами лучи различной интенсивности фиксируются либо на специальной фотопленке, либо детектором. Рассчитав полученную таким путем рентгенограмму (дифрактограмму), получают сведения о межплоскостных расстояниях в кристалле. Значение межплоскостных расстояний для каждого вещества строго индивидуально, поэтому рентгенограмма (дифрактограмма) однозначно характеризует исследуемое вещество.

ОБОРУДОВАНИЕ

По способу регистрации рентгеновских лучей вся аппаратура делится на два типа. К первому типу относятся приборы с фотографическим методом регистрации рентгеновских лучей на специальной рентгеновской пленке (в данном случае дифракционная картина представляет собой ряд концентрических пар черных полос), ко второму — приборы с

ионизационным методом регистрации, при котором рентгеновское излучение регистрируется с помощью различного типа счетчиков (сцинтилляционных, пропорциональных, полупроводниковых). Усиленный сигнал записывается в файл, а совокупность сигналов затем обрабатывается специальной программой. Условия фокусировки при ионизационном методе регистрации рентгеновских лучей таковы, что максимальную светосилу получают при облучении рентгеновским пучком максимально большой поверхности образца.

Дифрактометрические методы съемки рентгенограмм отличаются от фотографических тем, что дифракционная картина регистрируется последовательно во времени. Используется счетчик отраженных рентгеновских лучей, который перемещается по окружности таким образом, что угол дифракции θ при этом непрерывно изменяется. Для получения интенсивных рефлексов на рентгенодифрактограмме необходимо использовать фокусирующие методы съемки, при которых в достаточно узкую щель счетчика попадает рентгеновское излучение, отраженное от образца с относительно большой поверхностью. В дифрактометрах применяется фокусировка лучей от плоского образца по методу Брэгга - Брентано, допускающая вращение образца в собственной плоскости.

Образец расположен в центре окружности постоянного радиуса, по которой движется счетчик и на которой находится рентгеновская трубка. При этом образец вращается одновременно со счетчиком таким образом, чтобы поверхность образца все время была касательной к окружности фокусировки, на которой в данный момент находятся фокус рентгеновской трубки, центр образца и входная щель счетчика. Это условие выполняется, если угловая скорость вращения счетчика в 2 раза превышает угловую скорость вращения образца. Следовательно, если образец поворачивается на угол θ, то угол поворота счетчика будет 2θ (рис. 2). Измерение углов поворота осуществляется с помощью гониометра.

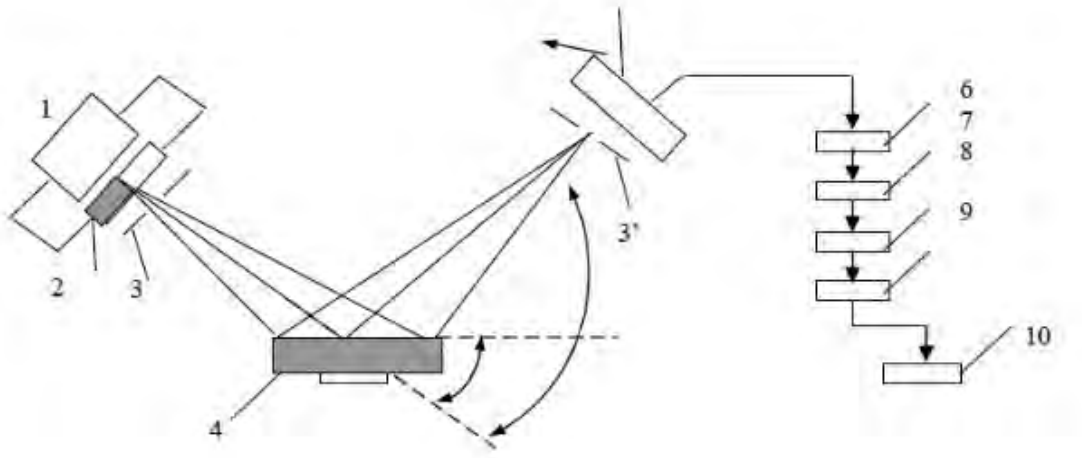


Рисунок 2 – Принципиальная схема дифрактометра. 1 – источник высокого напряжения; 2 – рентгеновская трубка; 3, 3' – диафрагмы; 4 – образец; 5 – счётчик квантов; 6 – фотоэлектронный умножитель; 7 – усилитель; 8 – дискриминатор; 9 – пересчётная схема; 10 – управляющий компьютер

Источником рентгеновского излучения в рентгеноструктурном анализе являются откачанные рентгеновские трубки (с вакуумом 10^{-5} – 10^{-6} мм рт. ст.), представляющие собой мощный диод, в котором поток ускоренных, обладающих высокой энергией, электронов бомбардирует материал анода. Зеркало анода изготавливают из металлов, для которых длины волн рентгеновского излучения лежат в пределах от 2,29 до 0,71 Å (W, Cr, Fe, Cu, Ni, Co, Mo, Ag).

Для дифракционных методов исследования органических веществ используют только характеристическое рентгеновское излучение, полученное на основе медных, молибденовых или кобальтовых анодов. Длины волн, используемые в дифракции методом порошка, соответствуют K_α-излучению анода. В качестве фильтра используют либо металлическую пластину (K_β-фильтр, имеющий край полосы поглощения между K_α и K_β длинами волн рентгеновского излучения), либо большой специальный кристалл-монохроматор, преломляющий K_α и K_β линии рентгеновского луча под различными углами.

Рентгеновское излучение является опасным для здоровья человека, поэтому необходимо соблюдать рекомендации по мерам предосторожности и

пределам уровней воздействия рентгеновского излучения, установленным национальным законодательством.

ПРОВЕРКА ПРИГОДНОСТИ ПРИБОРА (ЮСТИРОВКА)

Оптико-механическая система рентгеновского порошкового дифрактометра требует точной настройки (юстировки) и периодической проверки с использованием сертифицированных стандартных образцов. Минимизация систематических ошибок и оптимизация интенсивности дифрагируемых лучей, регистрируемых детектором, напрямую зависят от точности настройки и определяют качество результатов исследования методом порошковой дифрактометрии. Данную работу должен проводить только высококвалифицированный инженер-специалист.

ПРОБОПОДГОТОВКА

Для получения хороших рентгенограмм для съемки по методу «порошка» необходима тщательная подготовка образцов. Тонко измельченный порошок, который является поликристаллическим телом, набивают в капилляр диаметром 0,5 – 1 мм или насыпают и фиксируют в углублении специальной кюветы из кварцевого стекла (при съемке в дифрактометре).

Для фиксации образца в кювете достаточно простого придавливания: можно применять органические клеи (БФ, цапонлак и т.д.), а также обычные технические масла. Кроме того, порошок можно спрессовать и применить для съемки в виде таблетки диаметром до 25 мм.

Важным фактором, определяющим чувствительность метода, является размер кристаллов исследуемого вещества. Поэтому следует обратить внимание на тщательность растирания порошка, так как порошок, состоящий из крупных кристаллов, дает нечеткие, малоинтенсивные рентгенограммы. Растирать порошок следует в агатовой ступке агатовым пестиком (для исключения загрязнения пробы). Оптимальный размер кристаллов составляет около 5 – 10 мкм. Вместе с тем в некоторых случаях нельзя сильно перетирать пробу, так как сильное воздействие (особенно с

давлением) приводит к нарушению кристаллической структуры препарата, появлению напряжений в кристаллах (а значит, к ухудшению качества рентгенограммы). Следует учесть, что в случае, если размер кристаллов менее 0,1 мкм, то интерференционные линии могут быть размыты (уширение полос спектра), и при малом количестве фазы её линии могут сливаться с фоном.

КАЧЕСТВЕННЫЙ ФАЗОВЫЙ АНАЛИЗ

Качественным фазовым анализом называется установление числа фаз в данной системе и их идентификация. Рентгеновский метод фазового анализа основан на том, что каждое кристаллическое вещество дает специфическую интерференционную картину с определенным количеством, расположением и интенсивностью интерференционных линий, которые определяются природой и расположением атомов в данном веществе. Так как практически не существует двух кристаллических веществ, которые обладали бы одинаковой во всех отношениях кристаллической структурой, то рентгенограмма однозначно характеризует данное вещество. В смеси нескольких веществ каждое из них дает свою картину рентгеновской дифракции независимо от других. Полученная рентгенограмма смеси представляет собой сумму (наложение) ряда рентгенограмм индивидуальных веществ. Идентификация фазового состава образца обычно основана на визуальном или компьютерном сопоставлении его дифрактограммы с экспериментальной или рассчитанной дифрактограммой стандартного образца (сравнивают значения углов 2θ и относительные интенсивности пиков).

При съемке дифрактограмм с органических веществ обычно используют излучение Cu-K_α (интервал значений углов 2θ от 4° до 40°). При этом сходимость углов 2θ для одной кристаллической формы исследуемого вещества и стандартного образца находится в пределах ± 0,2°, тогда как относительные интенсивности пиков могут значительно различаться из-за эффектов преимущественной ориентации массы микрокристаллов.

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ ФАЗОВЫЙ АНАЛИЗ

Количественный рентгеновский фазовый анализ основан на зависимости интенсивности дифракционных отражений от содержания фазы в исследуемом многофазном поликристаллическом образце – интенсивность линии пропорциональна объемной доле данного компонента. Однако даже при одинаковом содержании определяемой фазы интенсивность дифракционного отражения будет меняться в зависимости от величины среднего коэффициента поглощения рентгеновских лучей в образце. Поэтому необходимо либо найти эту зависимость и определить коэффициент поглощения образца, либо использовать методы, позволяющие устранить влияние фактора поглощения. Известно несколько методов количественного фазового анализа:

- метод подмешивания (метод стандартных добавок) основан на сравнении интенсивностей линий на дифрактограмме, принадлежащих определяемой фазе, с интенсивностями линий для стандартного образца, количество которого в смеси заранее задано;
- метод независимого стандартного образца, при котором последовательно проводят съемку испытуемого вещества и стандартного образца – «метод внешнего стандарта» (наиболее распространенный метод);
- метод гомологических пар – получение серии рентгенограмм смесей и нахождение на них линий различных фаз одинаковой интенсивности;
- метод наложения состоит в сравнении рентгенограмм исследуемого образца и рентгенограмм отдельных составляющих в чистом виде;
- метод съемки без стандартного образца основан на том, что интенсивность линий на рентгенограммах фаз пропорциональна объемному содержанию фазы, и измеряя абсолютную интенсивность линий каждой фазы на рентгенограмме или отношение интенсивностей линий различных фаз, можно определить концентрацию каждой фазы.

ПОЛИМОРФНЫЕ ОБРАЗЦЫ

В качестве стандартного образца (метод стандартных добавок) применяют вещество, коэффициент поглощения которого должен быть близким к коэффициенту поглощения определяемой фазы; исследуемая фаза и стандартный образец должны быть достаточно измельчены и тщательно перемешаны. Вещество, выбираемое в качестве стандартного, должно удовлетворять следующему требованию: давать интенсивные и резкие линии на рентгенограмме, в том числе интенсивную линию вблизи самой интенсивной линии определяемого компонента. Расчет количества фазы (F_a) в случае смеси двух полиморфных фаз (a, b) проводят по уравнению:

$$F_a = \frac{1}{1+K(I_b/I_a)},$$

где K – отношение абсолютных интенсивностей двух чистых полиморфных фаз I_b/I_a, которое определяется измерением интенсивностей стандартных образцов.

Рентгенографический метод позволяет определить не только содержание кристаллической, но и аморфной фазы.

Содержание аморфной фазы определяют либо по разности единицы и всех кристаллических фаз (в долях), либо независимым способом. При втором способе учитывают, что интенсивность когерентного рассеяния рентгеновского излучения аморфной фазы пропорциональна ее содержанию. Кривая рассеяния на рентгенограмме образца имеет один или несколько пологих максимумов, обычно в области небольших углов рассеяния. При определении содержания аморфной фазы (C_a) с помощью эталонов используют соотношение:

$$C_a = I - \frac{I_a^0 - I_a}{I_a^0 - I_b} \quad ,$$

где I_a^0, I_a – интенсивности рассеяния полностью аморфным (эталон) и исследуемым образцами под некоторым фиксированным углом 2θ;

I_b – интенсивность рассеяния смесью кристаллических фаз, имеющей аналогичный полностью аморфному образцу химический состав.

Более точной мерой интенсивности рассеяния аморфной фазой служит интегральная интенсивность одного или нескольких максимумов.

Безэталонный метод основан на выделении средней интенсивности рассеяния рентгеновского излучения аморфной фазой I_a из средней интенсивности рассеяния образца I_n. Содержание аморфной фазы определяют по формуле:

$$C_a = \frac{I_a}{I_n} .$$

Оба метода используют только для сравнительной оценки доли аморфной фазы (C_a). Основным недостатком является влияние изменений состава образца на результат определения.

ПРИМЕНЕНИЕ РЕНТГЕНОВСКОЙ ПОРОШКОВОЙ ДИФРАКТОМЕТРИИ В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОМ АНАЛИЗЕ

Метод дифракции рентгеновских лучей на порошковом образце является инструментом для исследования поликристаллических субстанций лекарственных веществ.

Несмотря на то что рентгеноструктурный анализ монокристалла обеспечивает реальное понимание кристаллической структуры, использование такого метода для рутинных исследований кристалличности фармацевтических субстанций затруднено вследствие длительности (необходимость вырастить монокристалл) процедуры и трудоёмкости. Для общей оценки качества и структуры вещества обычно достаточно установить его полиморфную форму и идентичность.

Типичным применением метода рентгеновской порошковой дифрактометрии является оценка полиморфизма, сольватоморфизма, изучение переходов состояний «кристаллическое – аморфное» и оценка степени кристалличности, которую определяют с помощью калибровки. В

этом случае необходимо иметь в качестве эталонов чистые вещества: 100 % кристаллическое и 100 % аморфное.

Техника рентгеновской порошковой дифрактометрии – быстрый метод получения фундаментальной информации о кристаллической решетке вещества, поэтому его часто применяют для определения подлинности фармацевтических субстанций лекарственных препаратов, полученных в виде кристаллических порошков.

Вследствие простоты и информативности метод рентгеновской порошковой дифрактометрии используют также для контроля степени кристалличности отдельных партий субстанций лекарственных веществ.

Фотоколориметрия	**ОФС.1.2.1.1.0012.18** **Взамен ГФ X ст. ,** **ГФ XI, вып.1**

Настоящая общая фармакопейная статья посвящена методу количественного определения действующих веществ с помощью метода фотоколориметрии.

Фотоколориметрия – метод, основанный на измерении степени поглощения немонохроматического света испытуемым веществом с помощью фотоэлектроколориметров (ФЭК). Данный метод применим для окрашенных прозрачных растворов. Для определения концентраций растворов фотоколориметрическим методом пользуются законом Бугера-Ламберта-Бера в форме уравнения:

$$c = \frac{1}{xb} \times A$$

c – концентрация испытуемого раствора, моль/л;

A – оптическая плотность;

x – молярный показатель поглощения раствора, л/(моль*см);

b – толщина слоя вещества, см.

Величину *x* и *xb* определяют путем проведения серии предварительных измерений для растворов с известной концентрацией исследуемого вещества.

Для проведения измерений используют специальный прибор – фотоэлектроколориметр.

Фотоколориметр – оптический прибор, использующийся для измерения оптической плотности растворов в узком диапазоне спектра. Действие фотоколориметра основано на свойстве окрашенных растворов поглощать проходящий через них свет тем сильнее, чем выше в них концентрация светопоглощающего вещества. В отличие от спектрофотометра, измерения ведутся в луче не монохроматического, а полихроматического узкоспектрального света, формируемого специальными светофильтрами. Применение различных светофильтров с узкими спектральными диапазонами пропускаемого света позволяет определять по отдельности концентрации разных компонентов одного и того же раствора, так как они поглощают при разных длинах.

Обычно фотоколориметры используются для измерения оптической плотности растворов в диапазоне 315 – 630 нм и последующего определения концентрации этих растворов при помощи построения калибровочного графика.

Узкополосные светофильтры маркируются по длине волны максимального пропускания. В таблице 1 представлена стандартная маркировка светофильтров для ФЭК.

Таблица 1. Маркировка светофильтров.

Маркировка светофильтра	**Длина волны, соответствующая максимальному пропусканию светофильтра, нм**
1	315 ± 5
2	364 ± 5
3	400 ± 5
4	440 ± 10
5	490 ± 10
6	540 ± 10
7	572 ± 10
8	590 ± 10
9	630 ± 10

Перед началом проведения измерений необходимо выбрать светофильтр. Светофильтры нужно выбирать так, чтобы максимум и минимум поглощения определяемого вещества попадал в диапазон между максимумом пропускания и минимумом поглощения светофильтра.

Светофильтры необходимо выбирать по окраске анализируемого раствора. В зависимости от цвета раствора, а значит области поглощения, необходимо выбрать светофильтр, вырезающий соответствующий диапазон длин волн (таблица 2).

Таблица 2. Характеристики светофильтров.

Цвет раствора	**Область макс. светопоглощения (нм)**	**Цвет светофильтра**
Желто-зеленый	400 - 450	Фиолетовый
Желтый	450 - 480	Синий
Оранжевый	480 - 490	Зелено-синий
Красный	490 - 500	Сине-зеленый
Пурпурный	500 - 560	Зеленый
Синий	575 - 590	Желтый
Зелено-синий	590 - 625	Оранжевый

Фотоколориметрический метод достаточно точен, погрешность составляет 3-5 %. Наименьшая ошибка достигается при величине оптической плотности 0,434. В интервале значении величин оптической плотности от 0,30 до 0,70 ошибка составляет ±3 %. Измерения, выполненные с помощью фотоколориметра, отличаются простотой и быстротой проведения. Точность их во многих случаях не уступает точности других, более сложных методов химического анализа. Нижние границы определяемых концентраций в зависимости от рода вещества составляют от 10^{-3} до 10^{-8} моль/л.

Принцип работы: световой поток от лампы разделяется на 2 потока (верхний и нижний) и отражаясь от зеркал попадает на два одинаковых фотоэлемента. Поток, который идет через верхний световой канал проходит

через специально подобранный световой фильтр, конденсатор и оптический клин, а поток света, который идет через нижний световой канал проходит через нижний светофильтр Сф конденсатор и кюветы А, которая заполнена контролируемым веществом. Фотоприёмники Ф1 и Ф2 соединяются встречно и в их контур включается электронный усилитель. Меняя положения оптического клина, добиваются равенства световых потоков в обоих каналах. Тогда оба канала выдадут одинаковые фототоки и сигнал разбаланса на входе в электронный усилитель станет равен нулю, и индикатор гальванометра покажет ноль. После выставления показания прибора на ноль, т.е. уравновешивания схемы, кювету А помещают с контролируемым раствором в прибор, в следствии изменения равенства световых потоков возникнет разбаланс, который подастся на электронный усилитель. Для того, чтобы уровнять световые потоки необходимо перемещать оптический клин до тех пор, пока не перестанет подаваться сигнал разбаланса на усилитель, т.е. выровняются фототоки и стрелка, которая соединена с оптическим клином не покажет действующее значение концентрации раствора, размещенного в кювете А. Наиболее распространенными являются две принципиальные схемы фотоэлектроколориметров.

1) схема прямого действия с одним фотоэлементом;
2) дифференциальная схема с двумя фотоэлементами, рассчитанная на попадание пучков света, проходящих соответственно через испытуемый раствор и нулевой растворы, на два разных фотоэлемента.

Необходимую величину оптической плотности достигают подбором кюветы и концентрации анализируемого раствора.

К фотоколориметрам прилагается набор стеклянных кювет. Измерение оптической плотности легко летучих жидкостей проводят в закрытых крышкой кюветах. Для интенсивно окрашенных растворов применяют

кюветы с меньшей толщиной слоя, для слабо окрашенных растворов выбирают кюветы с большей толщиной поглощающего слоя.

В качестве приёмников излучения в них используются фотоэлементы (селеновые и вакуумные), фотоэлектронные умножители, фоторезисторы (фотосопротивления) и фотодиоды. Сила фототока приемников определяется интенсивностью падающего на них света и, следовательно, степенью его поглощения в растворе (тем большей, чем выше концентрация). Помимо фотоэлектрического колориметра (фотоколориметра) с непосредственным отсчетом силы фототока, распространены компенсационные фотоколориметры, в которых разность сигналов, соответствующих стандартному и измеряемому растворам, сводится к нулю (компенсируется) электрическим или оптическим компенсатором (например, клином фотометрическим); отсчет в этом случае снимается со шкалы компенсатора. Компенсация позволяет свести к минимуму влияние условий измерений (температуры, нестабильности свойств элементов колориметра) на их точность. Показания фотоколориметра не дают сразу значений концентрации исследуемого вещества в растворе – для перехода к ним используют калибровочные графики, полученные при измерении растворов с известными концентрациями.

Для повышения точности фотоколориметрических измерений при определении высоких концентраций веществ (от 10 до 100%) возможно использование дифференциального метода анализа.

Спектроскопия кругового дихроизма	**ОФС.1.2.1.1.0013.18** **Вводится впервые**

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на метод спектроскопии кругового дихроизма (КД-спектроскопия), основанного на анизотропии оптически активных молекул, при пропускании света, поляризованного по правому или левому кругу.

Область применения

КД-спектроскопия используется в основном для изучения структуры органических молекул, обладающих оптической изомерией. С помощью данного метода можно дифференцировать вклады полос поглощения различных изомеров в суммарную оптическую активность исследуемого образца. Этот метод может использоваться для анализа смесей оптических изомеров биологически активных веществ, для контроля качества лекарственных средств. Кроме того, КД-спектроскопия является популярным методом определения количества белка и контроля за его вторичной структурой в растворах (то есть за денатурационными изменениями).

Суть метода

При прохождении через любую оптически активную среду плоскополяризованного света, он становится эллиптически поляризованным. Данное явление связано с различными величинами поглощения средой двух волн, составляющих этого света, с противоположной круговой поляризацией. Разность этих величин поглощения называют круговым дихроизмом.

Полученные в ходе эксперимента спектры кругового дихроизма сравнивают со стандартными спектрами КД. Благодаря этому получают качественный и количественный состав исследуемого образца. Метод КД обладает высокой чувствительностью (вплоть до анализа десятков микрограммов субстанции).

Методика

Из образцов готовят растворы одинаковой концентрации. Концентрацию подбирают таким образом, чтобы при максимуме поглощения исследуемого вещества оптическая плотность составляла примерно 1.

Растворы помещают в кварцевую кювету и проводят измерение КД на соответствующем приборе в указанном диапазон длин волн. Далее проводят анализ полученных спектров, сравнивая их с реперными спектрами и проверяя наличие эффекта Коттона в области поглощения хромофора. Наличие или отсутствие данного эффекта может определить обладает ли образец оптической активностью.

Непосредственное измерение оптической плотности дает следующее выражение:

$$\boldsymbol{\Delta} A = A_1 - A_2 ,$$

где $\boldsymbol{\Delta} A$ – оптическая плотность кругового дихроизма;

A_1 – оптическая плотность для света с левой круговой поляризацией;

A_2 – оптическая плотность для света с правой круговой поляризацией.

Величину кругового дихроизма рассчитывают по следующей формуле:

$$\boldsymbol{\Delta}\varepsilon = \varepsilon_1 - \varepsilon_2 = \frac{\boldsymbol{\Delta} A}{\mathrm{c} \times l} ,$$

где $\boldsymbol{\Delta\varepsilon}$ – молярный круговой дихроизм или молярный дифференциальный дихроичный коээфициент поглощения, л·моль·см$^{-1}$;

$\boldsymbol{\varepsilon_1}$ - молярный коэффициент поглощения для света с левой круговой поляризацией;

$\boldsymbol{\varepsilon_2}$ - молярный коэффициент поглощения для света с правой круговой поляризацией;

с – концентрация вещества в исследуемом растворе, моль·л$^{-1}$;

l – длина оптического пути, см.

Кроме того, для характеристики кругового дихроизма также используют следующие единицы

Коэффициент ассиметрии:

$$g = \frac{\Delta\varepsilon}{\varepsilon},$$

Где **ε** – молярный коэффициент поглощения.

Молярная эллиптичность:

Некоторые типы приборов непосредственно показывают величину молярной эллиптичности Θ, выраженную в градусах. При использовании таких приборов молярная эллиптичность может быть рассчитана по следующему уравнению:

$$[\Theta] = \frac{\Theta \times M}{c \times l \times 10},$$

[Θ] – молярная величина эллиптичности, выраженная в градус×см^2×децимоль$^{-1}$;

Θ – величина эллиптичности, показываемая прибором;

M – относительная молекулярная масса исследуемого вещества;

c – концентрация исследуемого вещества в растворе, г/мл;

l – длина оптического пути, см.

Молярная эллиптичность также связана с молярным круговым дихроизмом уравнением:

$$[\Theta] = 2.303 \times \Delta\varepsilon \times \frac{4500}{\pi} \approx 3300 \times \Delta\varepsilon$$

Молярная эллиптичность часто используется в анализе белков и нуклеиновых кислот. В этом случае молярная концентрация, выраженная в единицах мономерных остатков, рассчитывается исходя и отношения молекулярной массы к числу аминокислот.

Для белков среднее значение относительной молекулярной массы мономерного остатка составляет от 100 до 120, для нуклеиновых кислот (в виде натриевой соли) – около 330.

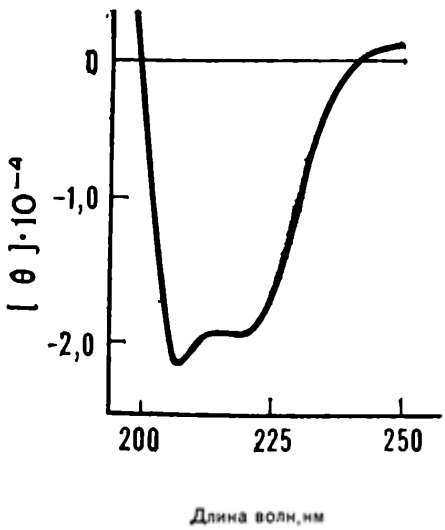


Рис. 1 Спектр кругового дихроизма на примере раствора альбумина.

Прибор

Основные составляющие КД-спектрометра или, по-другому, дихрографа:

- источник излучения (обычно ксеноновая лампа);

- система круговой поляризации света (двойной монохроматор, кварцевые призмы, двоякопреломляющий модулятор);

- детектор (фотоумножитель);

- усилитель сигнала.

Дихрограф способен производить измерения в диапазоне длин волн от 170 до 800 нм.

Калибровка

Для проверки правильности шкалы оптической плотности обычно используют раствор изоандростерона в диоксане (10 мг изоандростерона растворяют в 10,0 мл диоксана).Снимают КД-спектр в диапазоне от 280 нм до 360 нм. Величина $\Delta\boldsymbol{\varepsilon}$, измеренная при 304 нм, должна быть равна +3,3. Линейность модуляции проверяют обычно с помощью раствора (1S)-(+)-10-камфорсульфоновой кислоты в воде (10,0 мг кислоты в 10,0 мл воды). Сначала спектрофотометрически определяют точную концентрацию камфорсульфоновой кислоты, используя удельный показатель поглощения при 285 нм, равный 1,49. Далее снимают КД-спектр в диапазоне от 185 нм до

340 нм. Величина $\Delta\boldsymbol{\varepsilon}$, измеренная при 290,5 нм, должна быть равна от +2,2 до +2,5, а измеренная при 192,5 нм – от -4,3 до -5. Также возможно использование (1R)-(+)-аммония 10-камфорсульфоната.

Хроматография	**ОФС.1.2.1.2.0001.15**
	Взамен ГФ X
	Взамен ст. ГФ XI, вып.1

Хроматографией называется метод разделения смесей веществ, основанный на их многократном перераспределении между двумя контактирующими фазами, одна из которых неподвижна, а другая имеет постоянное направление движения. По механизму, лежащему в основе разделения, различают адсорбционную, распределительную, ионообменную и другие виды хроматографии.

В настоящее время используются следующие хроматографические методы анализа, представленные на рис.1

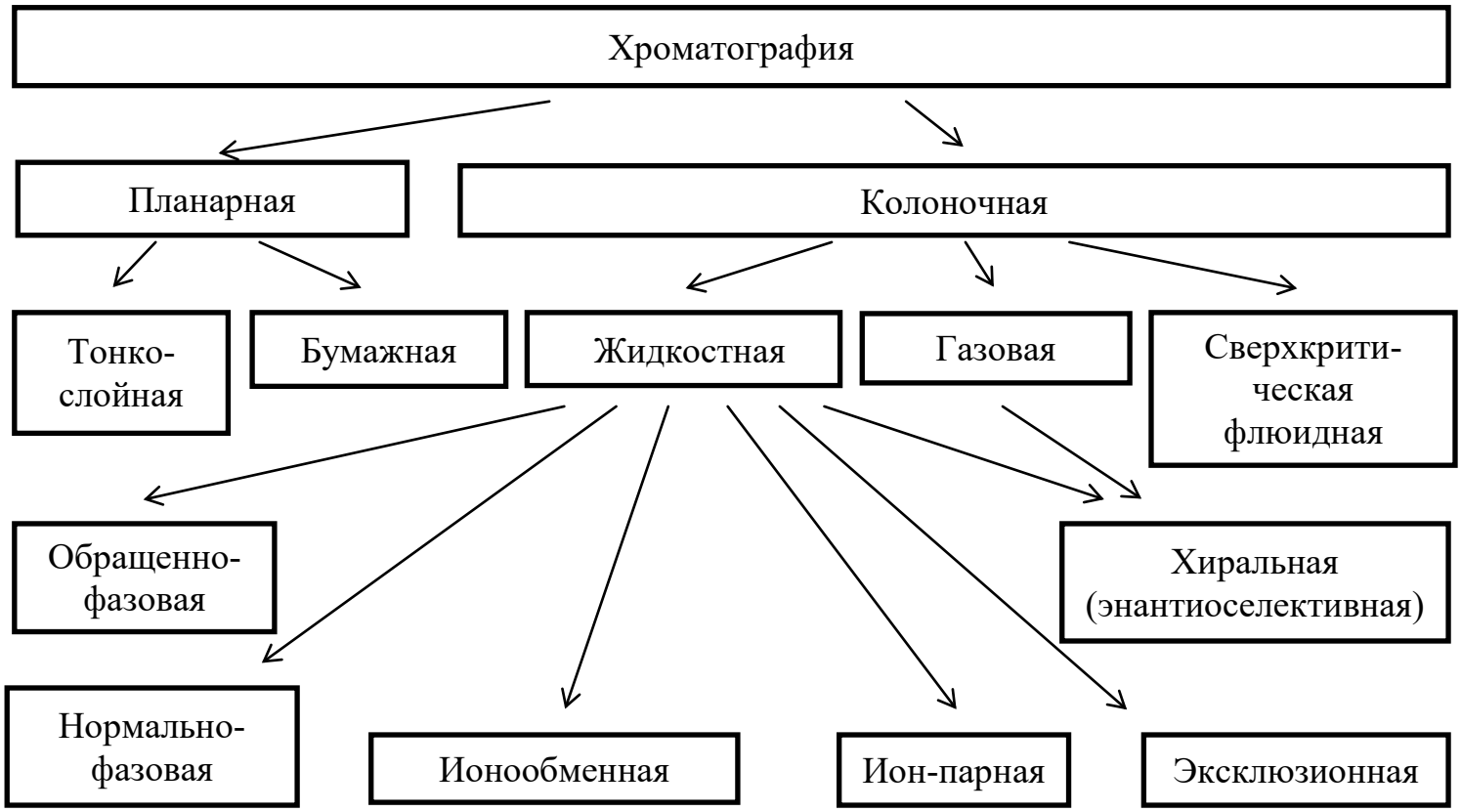


Рисунок 1– Методы хроматографического анализа.

Результат хроматографического разделения представляется в виде хроматограммы.

ХРОМАТОГРАММА И ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ

Хроматограмма представляет собой графическое или иное представление сигнала детектора, концентрации веществ в элюате или другой количественной величины, используемой для измерения концентрации веществ в элюате, от времени или объема подвижной фазы. В планарной (плоскостной) хроматографии хроматограммой называют также зафиксированную на бумаге (бумажная хроматография) или ТСХ-пластинке (тонкослойная хроматография) последовательность зон адсорбции веществ исходной (анализируемой) смеси.

Схематически хроматограммы представляют собой последовательность гауссовых пиков на базовой линии (рис. 2).

Базовая линия – сигнал от подвижной фазы.

Пик – часть хроматограммы, регистрирующая отклик детектора. Пик отображает постепенное нарастание концентрации вещества и последующее ее уменьшение. В случае линейной изотермы сорбции кривая, описывающая пик, приближается к кривой гауссова распределения.

Основание пика – продолжение базовой линии, соединяющее начало и конец пика.

Площадь пика (S) – площадь хроматограммы, заключенная между кривой, описывающей пик, и его основанием.

Высота пика (H) – расстояние от максимума пика до его основания, измеренное параллельно оси отклика детектора.

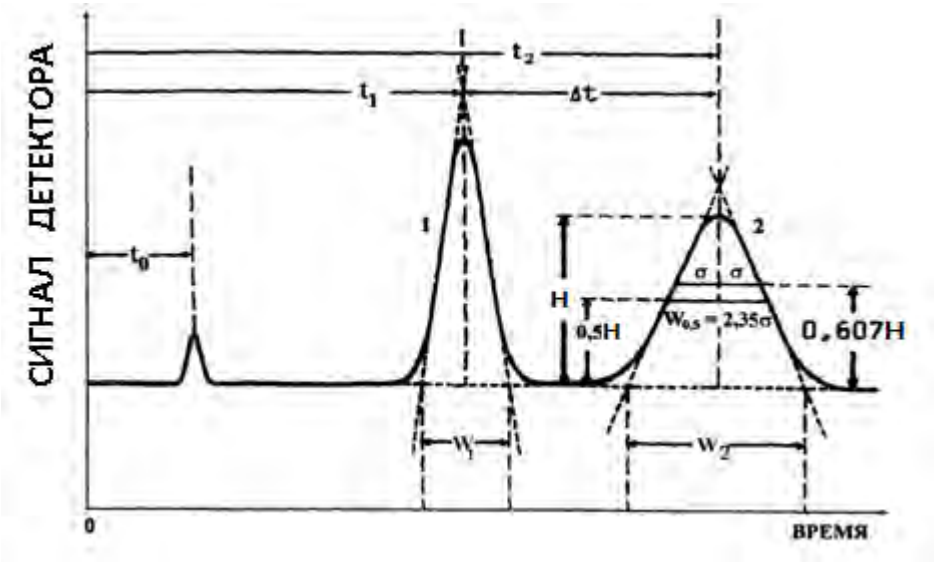


Рисунок 2 – Хроматограмма и основные хроматографические параметры: 1 и 2 – пики соединений 1 и 2; t_1 и t_2 – соответствующие времена удерживания; t_0 – время удерживания несорбирующегося вещества; W_1 и W_2 – ширина пиков у основания; $W_{0,5}$ – ширина пика на половине его высоты (предполагается гауссова форма пиков)

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ ДАННЫХ

Время удерживания (t_R или t) – время, необходимое для элюирования вещества. Соответствует времени появления максимума пика на хроматограмме.

Объем удерживания (V_R) – объем подвижной фазы, необходимый для элюирования вещества. Может быть вычислен по времени удерживания и скорости потока (F).

$$V_R = F \cdot t_R.$$

Объем удерживания, в отличие от времени удерживания, не зависит от скорости потока.

Время удерживания несорбирующегося вещества (t_0 *или* $t_м$) – время, необходимое для элюирования неудерживаемого на сорбенте вещества. В эксклюзионной хроматографии t_0 соответствует времени удерживания веществ, размер молекул которых больше, чем наибольшие поры сорбента.

Объем удерживания несорбирующегося вещества (V_0) – объем подвижной фазы, необходимый для элюирования неудерживаемого

вещества. Может быть вычислен по времени удерживания неудерживаемого вещества и скорости потока (*F*):

$$V_0 = F \cdot t_0.$$

В эксклюзионной хроматографии V_0 соответствует объему удерживания веществ, размер молекул которых больше, чем наибольшие поры сорбента.

Общее время удерживания подвижной фазы (t_t) – в эксклюзионной хроматографии время удерживания веществ, молекулы которых меньше, чем наименьшие поры сорбента.

Общий объем удерживания подвижной фазы (V_t) – в эксклюзионной хроматографии объем удерживания веществ, молекулы которых меньше, чем наименьшие поры сорбента.

Константа (коэффициент) распределения (K_0) – в эксклюзионной хроматографии характеристика элюирования вещества из определенной колонки, которую рассчитывают с помощью выражения:

$$K_0 = \frac{t_R - t_0}{t_t - t_0}.$$

Приведенное (исправленное) время удерживания вещества (t'_R) – время удерживания вещества за вычетом времени удерживания несорбируемого вещества. Может быть рассчитано по формуле:

$$t'_R = t_R - t_0.$$

Исправленное время удерживания не зависит от объема трубопроводов хроматографической системы, установленных между инжектором и колонкой.

Относительное время удерживания (*r*) – относительное приведенное (исправленное) время удерживания вещества 2 по веществу 1:

$$r = \frac{t_{R2} - t_0}{t_{R1} - t_0} = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}}.$$

Нескорректированное относительное время удерживания (*RRT*) – относительное время удерживания вещества 2 по веществу 1:

$$RRT = \frac{t_{R2}}{t_{R1}}.$$

Если не указано иное, значения относительного времени удерживания, приведенные в фармакопейных статьях, соответствуют нескорректированному относительному времени удерживания

Коэффициент емкости (*k'*) – коэффициент емкости колонки по веществу с временем удерживания t_R, показывающий, во сколько раз исправленное время удерживания вещества больше, чем время удерживания несорбируемого вещества.

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

Эффективность хроматографической системы – параметр, характеризующий степень размывания хроматографического пика**.** Эффективность выражается **числом теоретических тарелок (*N*)**:

$$N = 16 \cdot (\frac{t_R}{W})^2$$

или

$$N = 5{,}54 \cdot (\frac{t_R}{W_{0,5}})^2,$$

где W – ширина пика у основания;

$W_{0,5}$ – ширина пика на половине высоты.

При расчете числа теоретических тарелок значения времени удерживания и ширины пика должны быть приведены к одинаковой размерности.

Число теоретических тарелок зависит от природы определяемого вещества, его концентрации или объема, вводимого в систему, от колонки, температуры колонки и состава подвижной фазы.

Если не указано иное, то эффективность хроматографической системы, требования к которой приведено в фармакопейной статье, рассчитывается по формуле, использующей ширину пика на половине его высоты.

Фактор асимметрии (фактор симметрии) пика (A_s) рассчитывают по формуле:

$$A_s = \frac{W_{0,05}}{2f},$$

где $W_{0,05}$ – ширина пика на 5 % (1/20) его высоты;

f – расстояние между перпендикуляром, опущенным из вершины пика, и восходящей стороной пика на 5 % его высоты (рис. 3).

Если фактор асимметрии равен 1, то пик симметричен. Если фактор асимметрии больше 1, то это означает, что растянут задний фронт пика. Если фактор асимметрии меньше 1, то пик растянут спереди.

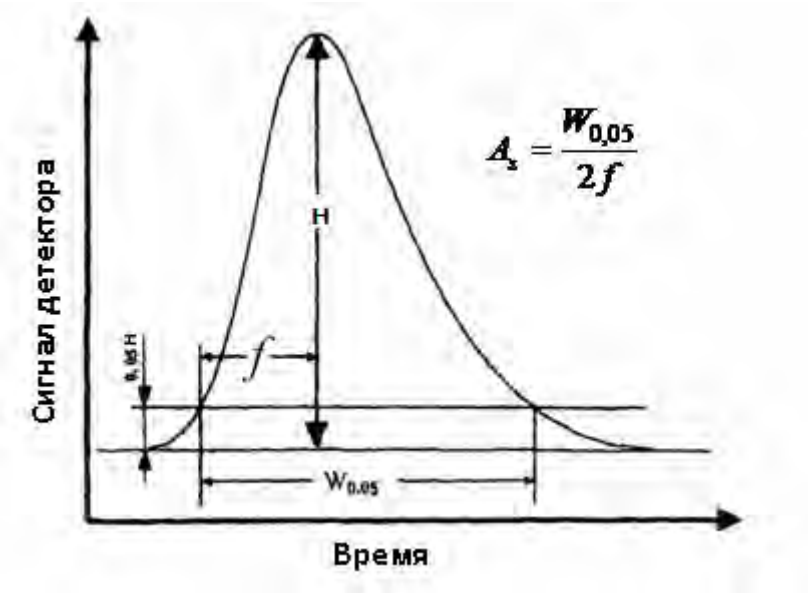


Рисунок 3 – Схема расчета фактора асимметрии пика

Разрешение (R_s).

Разрешение между пиками двух веществ смеси элюирующимися друг за другом рассчитывают по формулам:

$$R_s = \frac{2 \cdot (t_{R2} - t_{R1})}{W_1 + W_2}$$

или

$$R_s = \frac{1{,}18 \cdot (t_{R2} - t_{R1})}{(W_{0,5})_1 + (W_{0,5})_2},$$

при этом $t_{R2} \geq t_{R1}$. При расчете разрешения величины времени удерживания и ширины пиков должны быть приведены к одинаковой размерности.

Если не указано иное, то разрешение, требования к которому приведены в фармакопейной статье, рассчитывается по формуле, использующей ширину пиков на половине высоты.

В случае, если пики несимметричны и если интенсивность пиков значительно различается, параметр R_s не всегда корректно описывает разделение хроматографических пиков. Таким образом, даже при значениях $R_s \geq 1{,}5$ может наблюдаться неполное разделение пиков. В этих случаях при оценке разделяющей способности можно заменить параметр R_s на параметр «отношение максимум/минимум».

Отношение максимум/минимум (*p/v*), называемое также отношением «peak-to-valley», «пик – долина». Этот параметр позволяет оценить разделительную способность хроматографической системы. Значение *p/v* рассчитывается по формуле:

$$p/v = \frac{H_p}{H_v},$$

где H_p – высота меньшего пика относительно экстраполированной базовой линии;

H_v – высота низшей точки (седловины) кривой, разделяющей пики, относительно экстраполированной базовой линии (рис. 4).

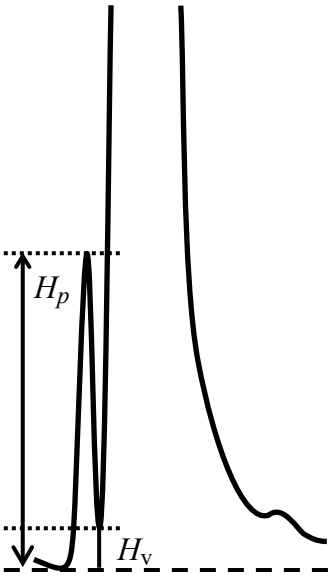


Рисунок 4 – Хроматограмма не полностью разделяемых веществ

Данное соотношение применяется для оценки разделительной способности хроматографической системы, если вещества смеси разделяются не полностью. Рассчитанное отношение максимум/минимум в значительной степени зависит от выбранного варианта интегрирования хроматограммы. Результаты измерения соотношения *p/v* будут некорректны в случае разметки меньшего пика методом экстраполяции смещенной базовой линии (методом тангенциальной касательной).

Отношение сигнал/шум (*S/N*).

Краткосрочный шум сигнала детектора (шум базовой линии) влияет на прецизионность количественного определения. Отношение сигнал/шум рассчитывают по формуле:

$$S / N = \frac{2H}{h},$$

где H – высота пика, соответствующего рассматриваемому веществу на хроматограмме указываемого стандартного раствора, измеренная от максимума пика до экстраполированной базовой линии. Экстраполяция базовой линии проводится для сигнала на участке базовой линии во временном интервале, продолжительность которого не менее 5-кратного значения ширины пика на его полувысоте;

h – размах фонового шума, измеряемый либо на хроматограмме контрольного (холостого) раствора (или раствора плацебо), либо на хроматограмме того же раствора стандартного образца.

Измерение размаха фонового шума проводится во временном интервале, продолжительность которого не менее 5-кратного значения ширины пика на его полувысоте, расположенном, если это возможно, равномерно по обе стороны от места возможного обнаружения пика. В случае использования для измерения шума хроматограммы контрольного (холостого) раствора (или раствора плацебо) измерение размаха фонового шума проводится во временном интервале, включающем в себя время удерживания рассматриваемого вещества, при этом продолжительность временного интервала, в котором проводится измерение шума, должна не менее чем в 5 раз превышать ширину на половине высоты для пика на хроматограмме указываемого раствора стандартного образца (рис. 5).

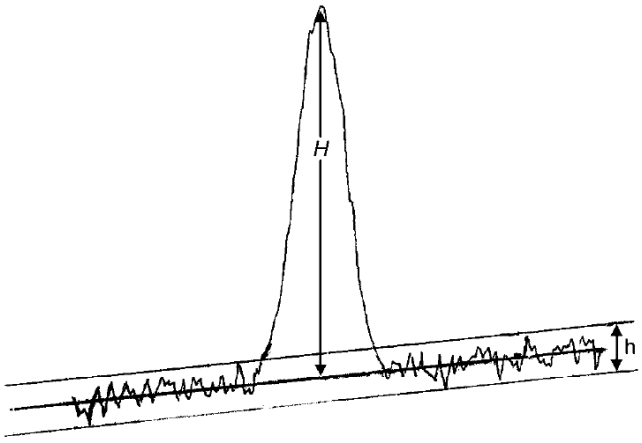


Рисунок 5 – Вычисление отношения сигнал/шум.

Объем задержки (*D*) (**объем задержки градиента**) представляет собой объем системы между точкой, в которой происходит смешение элюентов, и началом колонки.

Объем задержки градиента влияет на времена удерживания веществ и общий профиль наблюдаемой хроматографической картины, получаемой при использовании градиентного элюирования. Объем задержки хроматографической системы определяется следующим способом.

Колонка. Заменяют хроматографическую колонку капилляром (например, 1 м × 0,12 мм).

Подвижная фаза.

Подвижная фаза А - *вода.*

Подвижная фаза В - 0,1 % (об/об) раствор ацетона.

Время, мин	Подвижная фаза А, % (об/об)	Подвижная фаза В, % (об/об)
0 – 20	100 → 0	0 → 100
20 – 30	0	100

Скорость потока. Необходимая для создания давления, достаточного для стабильной работы насоса (например, 2 мл/мин).

Детектор. Спектрофотометрический при длине волны 265 нм.

Определяют время ($t_{0,5}$) в минутах, когда оптическая плотность увеличилась на 50 %. Вычисляют объем задержки:

$$D = t_D \cdot F,$$

где $t_D = t_{0,5} - 0{,}5t_G$, мин;

t_G – предварительно установленное время градиента (20 мин);

F – скорость потока, мл/мин.

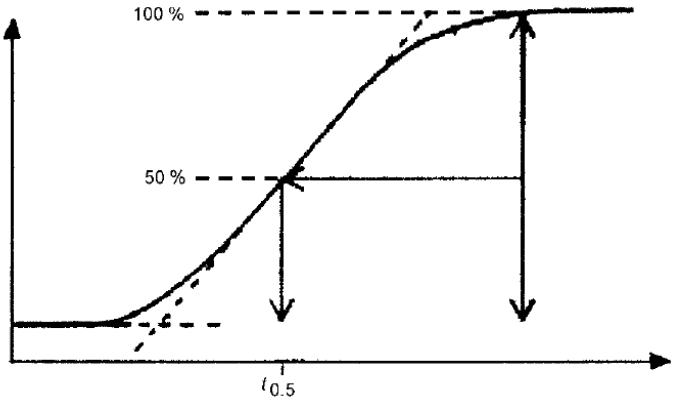


Рисунок 6 – Определение объема задержки градиента

Прецизионность системы в условиях повторяемости

Прецизионность системы в условиях повторяемости выражается в виде рассчитанного относительного стандартного отклонения в процентах [*RSD*

(%)] по результатам последовательных измерений не менее чем 3 вколов или нанесений раствора сравнения и рассчитывается по формуле:

$$RSD = \frac{100}{\bar{X}} \cdot \sqrt{\sum_{i=1}^{n} \frac{(X_i - \bar{X})^2}{n-1}},$$

где $\bar{X}$ – среднее значение результатов определений;

X_i – результаты единичных определений;

n – число определений.

В планарной хроматографии аналогом времени удерживания является **фактор удерживания (R_f)**:

$$R_f = \frac{a}{b},$$

где a – расстояние от точки нанесения пробы до центра пятна, характеризующего зону адсорбции;

b – расстояние от линии старта до линии фронта элюента.

На экспериментально определяемые значения R_f заметно влияют условия хроматографирования. Оценкой хроматографической подвижности, менее чувствительной к влиянию отклонений в условиях проведения эксперимента, является величина R_{st}, представляющая собой отношение величины R_f одного вещества к величине R_f другого, принятого за стандарт:

$$R_{st} = \frac{R_{f(a)}}{R_{f(st)}}.$$

Величины R_f и R_{st} используют для идентификации веществ. Обычно выбор стандарта осуществляется так, чтобы значение R_{st} анализируемого вещества было в пределах от 0,5 до 2,0. Схема определения этих величин приведена на рис. 7.

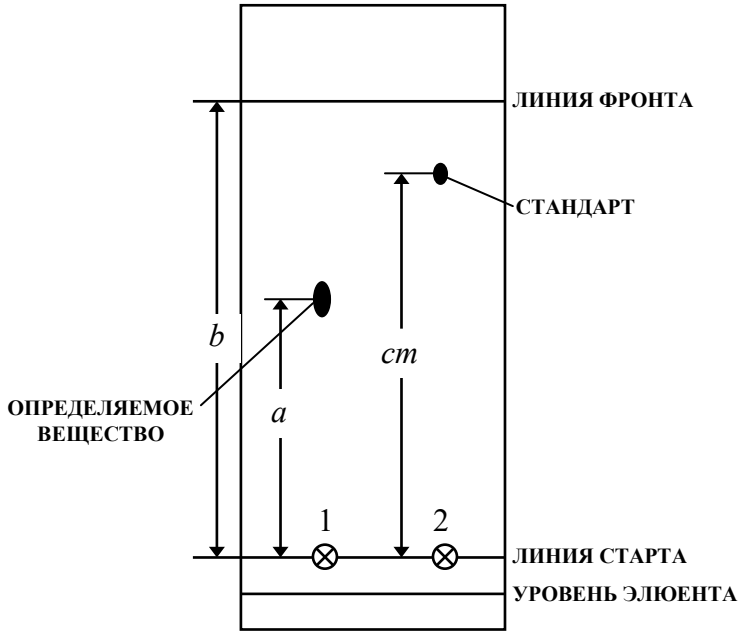


Рисунок 7 – Схема определения значений R_f и R_{st}.

⊗ – место нанесения образца на линию старта; 1 – анализируемое вещество (*a*); 2 – вещество-стандарт (*cm*); *b* – расстояние от линии старта до линии фронта элюента.

Данные планарной хроматографии могут быть представлены в виде денситограмм.

РАСЧЕТ СОДЕРЖАНИЯ ОПРЕДЕЛЯЕМЫХ ВЕЩЕСТВ

При расчетах содержания определяемых веществ пики растворителей и реактивов, подвижной фазы или среды (матрицы) образца не учитываются.

Существуют 4 основных метода расчета концентрации анализируемого вещества по хроматографическим данным.

1. Метод нормирования (метод внутренней нормализации).

Применение данного метода основано на предположении, что на хроматограмме зарегистрированы все вещества, входящие в состав анализируемой смеси, и что доля площади (высоты) каждого пика от суммы площадей (высот) всех пиков соответствует содержанию вещества в массовых процентах. Процентное содержание вещества в анализируемой смеси рассчитывается путём определения площади соответствующего пика как процентной части общей площади всех пиков, за исключением пиков, соответствующих растворителям или реактивам, подвижной фазе или

матрице образца. Содержание каждого вещества в смеси в процентах может быть вычислено по формуле:

$$X_i = \frac{S_i \cdot 100}{\sum_{i=1}^{n} S_i},$$

где S_i – площадь (высота) i-го пика;

$\sum_{i=1}^{n} S_i$ – сумма площадей (высот) всех пиков на хроматограмме.

Если чувствительность детектора различна по отношению к каждому из веществ, то вводят поправочные коэффициенты k_i. Относительный коэффициент отклика детектора, обычно называемый фактором отклика, обозначает чувствительность детектора для данного вещества относительно стандартного вещества. Поправочный коэффициент – это число, обратное фактору отклика.

Поправочные коэффициенты рассчитывают относительно основного вещества анализируемой смеси или другого стандартного вещества по формуле:

$$k_i = \frac{C_i \cdot S_0}{C_0 \cdot S_i},$$

где C_i и C_0 – концентрация i-го вещества и стандартного вещества соответственно;

S_i и S_0 – площадь (высота) пика i-го вещества и стандартного вещества соответственно.

Данные коэффициенты могут не учитываться в случае, если они находятся в пределах диапазона 0,8 – 1,2.

При использовании поправочных коэффициентов выражение для расчета количественного содержания приобретает вид:

$$X_i = \frac{k_i \cdot S_i \cdot 100}{\sum_{i=1}^{n} k_i S_i}.$$

При проведении испытания на примеси методом нормализации или методом внешнего стандарта с использованием разведения раствора испытуемого образца в качестве раствора сравнения учитывают все указанные в нормативной документации поправочные коэффициенты, значение которых выходит за пределы диапазона 0,8 – 1,2.

2. Метод внешнего стандарта. Концентрацию испытуемого вещества определяют путём сравнения сигнала (пика), полученного на хроматограммах испытуемого раствора, и сигнала (пика), полученного на хроматограммах раствора стандартного образца.

Концентрацию определяемого вещества в испытуемом растворе рассчитывают по формуле:

$$C = \frac{S \cdot C_0}{S_0},$$

где S и S_0 – средние значения площадей (высот) пиков на хроматограммах испытуемого и стандартного растворов соответственно;

C и C_0 – концентрации определяемого и стандартного растворов соответственно.

Количественное определение содержания примесей методом внешнего стандарта предпочтительнее проводить с использованием стандартных растворов примесей с концентрациями, близкими к их ожидаемым концентрациям в испытуемом растворе.

В качестве раствора стандартного образца для количественного определения примесей возможно использование раствора основного вещества. В этом случае разведение подбирается таким образом, чтобы концентрация основного соединения в растворе стандартного образца по отношению к его концентрации в испытуемом растворе была близка к ожидаемой концентрации примесей в испытуемом растворе. В этом случае следует учесть факторы отклика примесей по отношению к основному веществу, если их значения выходят за рамки 0,8 – 1,2.

Частным случаем метода внешнего стандарта является **метод калибровочной кривой,** в ходе которого определяют взаимосвязь между измеренным или обработанным сигналом (*y*) и количеством (концентрацией, массой и т.д.) определяемого вещества (*x*) и рассчитывают уравнение калибровочной функции. Результаты испытания рассчитывают из измеренного или обработанного сигнала с помощью обратной функции.

3. Метод внутреннего стандарта. Концентрацию определяемого вещества определяют путём сравнения отношения сигналов (площадей или высот пиков), соответствующих определяемому веществу и внутреннему стандарту, на хроматограмме испытуемого раствора и отношения сигналов (площадей или высот пиков), соответствующих определяемому веществу и внутреннему стандарту, на хроматограмме раствора стандартного образца. Метод внутреннего стандарта основан на введении в анализируемую смесь определенного количества стандартного вещества (внутренний стандарт). В испытуемый и стандартный растворы вводят известные количества внутреннего стандарта, хроматографируют растворы и определяют отношения площадей (высот) пиков определяемого вещества к площади (высоте) пика внутреннего стандарта в испытуемом и стандартном растворах.

Концентрацию определяемого вещества (*X*) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{B \cdot C_0}{B_0},$$

где $B = \frac{S}{S_{\text{int}}}$ – отношение площади (высоты) пика определяемого вещества к площади (высоте) пика внутреннего стандарта в испытуемом растворе;

$B_0 = \frac{S_0}{S_{\text{int}}}$ – отношение площади (высоты) пика определяемого вещества к площади (высоте) пика внутреннего стандарта в растворе стандартного образца;

C_0 – концентрация определяемого вещества в растворе стандартного образца.

В качестве внутреннего стандарта выбирается вещество, отсутствующее в испытуемой пробе, не взаимодействующее с определяемым веществом и другими веществами пробы, обладающее достаточной стабильностью, полностью отделяющееся от веществ пробы и не содержащее примесей с временами удерживания, совпадающими с временем удерживания определяемого вещества. Концентрация внутреннего стандарта должна быть близка к концентрации определяемых веществ, а структура и свойства по возможности аналогичны структуре и свойствам определяемых веществ.

4. Метод стандартных добавок. Концентрация определяемого вещества определяется путём сравнения сигнала (площади или высоты пика), соответствующего определяемому веществу, на хроматограмме испытуемого раствора, и сигнала (площади или высоты пика) определяемого вещества на хроматограмме испытуемого раствора с известной добавкой определяемого вещества. Метод стандартных добавок основан на введении в анализируемую смесь известного количества определяемого вещества и сравнения сигналов, полученных для испытуемого раствора со стандартной добавкой и без добавки определяемого вещества. При внесении стандартной добавки стараются минимизировать разбавление испытуемого образца, чтобы измерения раствора со стандартной добавкой и без проходили в одинаковых условиях с одинаковым влиянием матрицы. Количество вводимого в стандартной добавке определяемого вещества должно быть соизмеримо с его предполагаемым содержанием в испытуемом образце. После проведения испытания сравнивают полученные значения интенсивности и рассчитывают количественное содержание определяемого вещества C_x по формуле:

$$C_x = C_{\text{стд}} \cdot \frac{S_x}{S_{\text{стд}+x} - S_x},$$

где $C_{\text{стд}}$ – концентрация стандартной добавки;

S_x – интенсивность сигнала определяемого вещества (площадь или высота пика) для испытуемого раствора без стандартной добавки;

$S_{стд+x}$ – интенсивность сигнала определяемого вещества (площадь или высота пика) для испытуемого раствора со стандартной добавкой.

При необходимости формулу корректируют с учетом разбавлений испытуемого раствора за счет введения стандартной добавки.

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО РАЗМЕТКЕ И ИНТЕГРИРОВАНИЮ ХРОМАТОГРАММ ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ ПРИМЕСЕЙ

Если не указано иное, в испытаниях на содержание примесей в качестве **порога игнорирования** (неучитываемый предел, уровень содержания вещества, при котором и при меньшем содержании пик не принимается во внимание) принимают величину 0,05 % от содержания основного вещества.

В случаях, когда при испытании на примеси требуется определение суммарного содержания примесей или количественного определения примеси, при интерпретации хроматограммы важно выбрать подходящие условия интегрирования и значения **порога интегрирования [**интенсивность сигнала пика соединения (высоты или площади)], при котором (и при меньшем) пик не учитывается системой сбора данных и не участвует в количественных расчетах.

С целью разметки на хроматограмме всех пиков, подлежащих учету, заданный порог интегрирования системы сбора данных не должен превышать половину порога игнорирования.

Интегрирование площади пика любой примеси, пик которой не полностью разделяется с основным пиком, предпочтительно проводить экстраполяцией смещенной базовой линии (методом тангенциальной касательной). Использование других способов интегрирования должно быть специально оговорено в фармакопейной статье.

ОЦЕНКА ПРИГОДНОСТИ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ

Испытания пригодности системы являются неотъемлемой частью методики и используются для того, чтобы убедиться в надлежащем функционировании хроматографической системы и обеспечить выполнение предъявляемых к ней требований.

При проведении испытаний используемое оборудование должно быть квалифицировано и способно к функционированию надлежащим образом.

Для оценки пригодности системы указывают:

– требования к параметрам, характеризующим форму пика [эффективность хроматографической системы N и фактор асимметрии (фактор симметрии) A_s];

– требования к разделительной способности (разрешение между пиками R_S или отношение пик — долина p/v);

– требования к воспроизводимости (относительное стандартное отклонение, *RSD*) значений площади или высоты пиков, а также времен удерживания пиков в случае оценки подлинности соединений;

– требования к чувствительности при проведении испытания на примеси [минимально определяемая концентрация (фактический предел количественного определения) примеси]. Оценивается посредством расчета отношения сигнал/шум для раствора соответствующей концентрации.

Если в фармакопейной статье не указано иное, должны выполняться следующие требования и все дополнительные требования, приведенные в нормативном документе:

– в испытаниях на примеси или количественное содержание для пика на хроматограмме растворе стандартного образца, используемого для количественных определений, значение величины фактора асимметрии (фактора симметрии) A_s должно находиться в пределах от 0,8 до 1,5;

– разрешение между пиками $R_s \geq 1{,}5$ (в случае не полностью разделенных пиков вместо разрешения может быть использовано

соотношение *p/v*. При этом требования к минимальному значению соотношения *p/v* устанавливаются в фармакопейной статье);

– отношение сигнал/шум для пика вещества, полученное для раствора с концентрацией, равной требуемому уровню минимально определяемой концентрации, должно быть не менее 10. Требуемый уровень минимально определяемой концентрации [фактический предел количественного определения (ПКО)] зависит от того, предполагает ли методика вычисление содержания примесей, или только полуколичественную оценку, когда результат представляется в виде «менее *X*» или «не более *X*», где *X* – допустимое содержание примеси. Для методик, предполагающих вычисление содержания примесей, минимальная определяемая концентрация для применяемой хроматографической системы не должна превышать значение порога игнорирования (если не указано иное – 0,05 % относительно концентрации основного вещества в испытуемом растворе). Для полуколичественных методик минимальная определяемая концентрация для применяемой хроматографической системы не должна превышать максимально допустимое содержание примеси. При необходимости оценки содержания нескольких примесей требуемый уровень минимальной определяемой концентрация для применяемой хроматографической системы определяется примесью, нормы содержания которой наиболее строги. Если в фармакопейной статье не указано иное, то раствор вещества минимально определяемой концентрации для оценки чувствительности детектирования можно приготовить растворением стандартного образца вещества в том же растворителе, который используется для приготовления испытуемого раствора, с уровнем концентрации 0,05 % относительно концентрации основного вещества в испытуемом растворе.

Требования к прецизионности системы в условиях повторяемости при количественном определении основного вещества в субстанциях

При количественном определении основного вещества в фармацевтических субстанциях при содержании основного вещества,

близком к 100 %, максимально допустимое относительное стандартное отклонение значений интенсивности (площади или высоты) пика основного вещества для заданного количества повторных введений стандартного раствора RSD_{max} вычисляется по формуле:

$$RSD_{\max} = \frac{K \cdot B \cdot \sqrt{n}}{t_{90\,\%,n-1}},$$

где K – константа (0,349), полученная из выражения:

$$K = \frac{0,6}{\sqrt{2}} \cdot \frac{t_{90\%,5}}{\sqrt{6}},$$

в котором множитель $\frac{0,6}{\sqrt{2}}$ соответствует значению RSD_{max} после 6 повторных инжекций для B = 1,0;

B – верхний предел содержания основного вещества, приведенный в фармакопейной статье, минус 100 %;

n – число повторных введений стандартного раствора, ($3 \leq n \leq 6$);

$t_{90\,\%,\ n-1}$ – коэффициент Стьюдента (двусторонний) при доверительной вероятности 90 % с ($n - 1$) степенью свободы.

Если в фармакопейной статье не указано иное, то значение *RSD* не должно превышать величин RSD_{max}, приведенных в таблице. Данное требование не применяется при испытаниях на примеси.

Таблица – Максимально допустимое относительное стандартное отклонение RSD_{max} в зависимости от верхнего предела содержания основного вещества и числа отдельных введений проб

B, %	Число отдельных введений проб (вколов)			
	3	4	5	6
	Максимально допустимое относительное стандартное отклонение RSD_{max}			
2,0	0,41	0,59	0,73	0,85
2,5	0,52	0,74	0,92	1,06
3,0	0,62	0,89	1,10	1,27

Соответствие критериям пригодности системы должно поддерживаться на протяжении всего испытания. В зависимости от различных факторов, например, частоты использования методики и опыта работы с хроматографической системой, аналитик выбирает соответствующую схему проверки, подтверждающую соответствие этим требованиям.

В ***планарной хроматографии*** при проведении испытаний, регламентирующих наличие посторонних примесей/родственных соединений, должно быть предусмотрено определение предела обнаружения определяемых примесей и разделительной способности хроматографической системы.

Для подтверждения пригодности системы возможно одновременное использование двух тестов: «Подтверждение разделительной способности» и «Подтверждение чувствительности».

Тест «Подтверждение разделительной способности» проводят путём нанесения на пластинку и последующего хроматографирования специального стандартного раствора, содержащего два или более веществ с известными значениями R_f. После хроматографирования эти вещества должны разделиться, образуя зоны адсорбции, значения R_f которых равны заданным.

Тест «Подтверждение чувствительности» позволяет оценить чувствительность проявления. Он заключается в нанесении определённого количества стандартного вещества, хроматографируемого в условиях предыдущего теста и проявляемого тем же реагентом. Зона адсорбции стандартного вещества должно чётко обнаруживаться.

В каждом случае природа стандартных веществ, состав стандартного раствора, наносимые количества, приблизительные значения R_f устанавливают в фармакопейных статьях.

При необходимости для достижения требуемых критериев пригодности хроматографической системы проводится корректировка хроматографических условий.

КОРРЕКТИРОВКА УСЛОВИЙ ХРОМАТОГРАФИРОВАНИЯ

Далее приводятся пределы возможных изменений различных параметров хроматографической методики, которые могут быть внесены в нее для соответствия требованиям пригодности системы без принципиального изменения методик. Корректировка условий градиентного элюирования является более критичной, чем изократических условий, так как может вызвать сдвиг пиков на другую стадию градиента, и, таким образом, привести к некорректной идентификации пиков, наложению пиков или сдвигов, при которых элюирование интересующих соединений происходит после указанного времени регистрации хроматограммы. При внесении изменений, отличных от приведенных ниже, требуется проведение повторной валидации методики.

Проверка пригодности системы должна быть включена в методики для подтверждения получения разделения, требуемого для надлежащего проведения испытания. Тем не менее, поскольку неподвижные фазы описаны только в общем виде, и существует огромное количество доступных коммерческих фаз, отличающихся по хроматографическому поведению, некоторая корректировка условий хроматографирования может потребоваться для выполнения требований пригодности системы. В методиках с использованием обращенно-фазовой жидкостной хроматографии корректировки различных параметров не всегда приводят к удовлетворительному разделению. В этом случае может возникнуть необходимость замены одной колонки на другую, такого же типа, обеспечивающую желаемое хроматографическое поведение.

Если в фармакопейной статье не указано иное, допустимы следующие изменения параметров хроматографической системы.

Тонкослойная и бумажная хроматография

Состав подвижной фазы: количество растворителя, содержание которого в смеси наименьшее, может изменяться в пределах ± 30 % (относительное содержание) или ± 2 % (абсолютное содержание) в

зависимости от того, какая из величин будет больше. Абсолютное содержание других веществ не может быть изменено более чем на 10 %.

Пример 1: для вещества, содержание которого составляет 10 % подвижной фазы, изменение относительного содержания на 30 % приведет к изменению его абсолютного содержания до 7 – 13 %, тогда как изменение на 2 % по абсолютному содержанию приведет к изменению абсолютного содержания до 8 – 12 %. Допустимое изменение по относительному содержанию больше, чем допустимое изменение по абсолютному содержанию. Таким образом, допускается изменение содержания 7 – 13%.

Пример 2: для вещества, содержание которого составляет 5 % подвижной фазы, изменение относительного содержания на 30 % приведет к изменению его абсолютного содержания до 3,5 – 6,5 %, тогда как изменение на 2 % по абсолютному содержанию приведет к изменению его абсолютного содержания в подвижной фазе до 3 – 7 %. В этом примере допустимое изменение по абсолютному содержанию больше, чем допустимое изменение по относительному содержанию, и допустимым диапазоном содержания является 3 – 7 %.

pH среды водного компонента подвижной фазы: ± 0,2 pH, если иное не указано в нормативном документе, или ± 1,0 pH в случаях испытания неионизируемых веществ.

Концентрация солей в буферном веществе подвижной фазы: ± 10 %.

Наносимый объём. При использовании пластинок с малым размером частиц сорбента (2 – 10 мкм) наносимый объём может быть изменен на 10 – 20 % от заявленного объёма.

Жидкостная хроматография: изократическое элюирование

Состав подвижной фазы: количество растворителя, содержание которого в смеси наименьшее, может изменяться в пределах ± 30 % (относительное содержание) или ± 2 % (абсолютное содержание) в зависимости от того, какая из величин будет больше. Абсолютное содержание других веществ не может быть изменено более чем на 10 %.

pH среды водного компонента подвижной фазы: ± 0,2 pH, если иное не указано в нормативном документе, или ± 1,0 pH в случаях испытания неионизируемых веществ.

Концентрация солей в буферном веществе подвижной фазы: ± 10 %.

Скорость потока подвижной фазы: ± 50 %, большая степень изменений допустима при одновременном изменении размеров колонки. При необходимости одновременного изменения размеров колонки и скорости потока сначала рассчитывается номинальная скорость потока для колонки, размеры которой отличаются от приведенной в нормативном документе, а затем допускается корректировка полученного значения скорости потока на ± 50 %.

Параметры колонки

Неподвижная фаза:

- замена типа неподвижной фазы недопустима (например, недопустима замена фазы C_{18} на фазу C_8);
- размер частиц: максимальное уменьшение размера частиц 50 %, увеличение не допускается.

Размеры колонки

Длина колонки: ± 70 %,

внутренний диаметр колонки: ± 25 %.

При изменении размеров колонки скорость потока пересчитывают, используя следующее уравнение:

$$F_2 = F_1 \cdot \frac{l_2 \cdot d_2^2}{l_1 \cdot d_1^2},$$

где F_1 – скорость потока, указанная в нормативном документе, мл/мин;

F_2 – скорректированная скорость потока, мл/мин;

l_1 – длина колонки, указанная в нормативном документе, мм;

l_2 – длина используемой колонки, мм;

d_1 – внутренний диаметр колонки, указанный в нормативном документе, мм;

d_2 – внутренний диаметр используемой колонки, мм.

Температура: ± 10 % от указанной рабочей температуры, если не указано иначе.

Длина волны детектора. Изменения не допускаются.

Вводимый объём пробы. Может быть уменьшен при условии, что чувствительность фактически применяемой хроматографической системы (минимально определяемая концентрация) и прецизионность системы в условиях повторяемости для определяемых соединений остаются удовлетворительными.

Жидкостная хроматография: градиентное элюирование

Изменение хроматографических условий для систем с градиентом требует большей осторожности, чем для изократических.

Состав подвижной фазы/профиль градиентного элюирования: незначительные изменения состава подвижной фазы и системы градиента являются приемлемыми при условии, что:

- выполнены требования пригодности системы;
- основной пик элюируется в пределах ± 15 % от обозначенного времени удерживания;
- элюирующая способность конечного состава подвижной фазы не менее предписанного состава.

Если при использовании градиентного элюирования не может быть достигнуто соответствие требованиям пригодности системы, рекомендуется оценить объем задержки градиента или сменить используемую колонку.

Объем задержки градиента. Конфигурация используемого оборудования может значительно изменить разрешение, указанные абсолютные и относительные времена удерживания. Это может произойти из-за отличия объема задержки градиента используемой системы от объема задержки градиента системы, с помощью которой проводилась валидация методики. В нормативном документе часто перед началом программы градиента включена изократическая стадия, чтобы можно было адаптировать

систему к временным точкам градиента с учетом разницы объема задержки у системы, использованной для разработки методики, и у фактически использующейся системы. Решение о необходимости адаптации длительности изократической стадии для данного аналитического оборудования принимается пользователем. Если объем задержки, использованный при разработке методики, приведен в нормативном документе, то интервалы времени (t), указанные в таблице градиента, можно заменить адаптированными интервалами времени (t_c), рассчитанными с помощью следующего уравнения:

$$t_c = t - \frac{D - D_0}{F} \ ,$$

где D – объем задержки, мл;

D_0 – объем задержки, использованный при разработке методики, мл;

F – скорость потока, мл/мин.

Изократическая стадия, введенная с этой целью, может быть исключена, если имеются данные валидации по применению методики без этой стадии.

pH среды водного компонента подвижной фазы. Изменения не допускаются.

Концентрация солей в буферном веществе подвижной фазы. Изменения не допускаются.

Скорость потока. Изменения допустимы при изменении размеров колонки.

Параметры колонки

Неподвижная фаза:

– замена типа неподвижной фазы недопустима (например, недопустима замена C_{18} на C_8);

– размер частиц: изменения не допускаются;

Размеры колонки

– длина колонки: ± 70 %;

– внутренний диаметр колонки: ± 25 %;

При изменении размеров колонки скорость потока пересчитывают, используя следующее уравнение:

$$F_2 = F_1 \cdot \frac{l_2 \cdot d_2^2}{l_1 \cdot d_1^2},$$

где F_1 – скорость потока, указанная в нормативном документе, мл/мин;

F_2 – скорректированная скорость потока, мл/мин;

l_1 – длина колонки, указанная в нормативном документе, мм;

l_2 – длина используемой колонки, мм;

d_1 – внутренний диаметр колонки, указанный в нормативном документе мм;

d_2 – внутренний диаметр используемой колонки, мм.

Температура. ± 5 % от указанной рабочей температуры, если не указано иначе.

Длина волны детектора. Изменения не допускаются.

Вводимый объём пробы. Может быть уменьшен при условии, что детектирование (предел количественного определения) и сходимость отклика (*RSD* площадей или высот) для пика (пиков) определяемых соединений остаются удовлетворительными.

Газовая хроматография

Параметры колонки

Неподвижная фаза:

– размер частиц: максимальное уменьшение на 50 %, увеличение не допускается (набивные колонки);

– толщина плёнки: от минус 50 % до плюс 100 % (капиллярные колонки).

Размеры колонки

–Длина колонки: ± 70 %;

–Внутренний диаметр колонки: ± 50 %.

Скорость потока: ± 50 %.

Температура: ± 10 %.

Вводимый объём пробы. Может быть уменьшен при условии, что чувствительность фактически применяемой хроматографической системы и прецизионность системы в условиях повторяемости для определяемых соединений остаются удовлетворительными.

Сверхкритическая флюидная хроматография

Состав подвижной фазы. Для набивных колонок количество растворителя, содержание которого в смеси наименьшее, может изменяться в пределах ± 30 % (относительное содержание) или ± 2 % (абсолютное содержание) в зависимости от того, какая из величин будет больше; для систем с капиллярной колонкой изменения не допускаются.

Длина волны детектора. Изменения не допускаются.

Параметры колонки

Неподвижная фаза*:*

– размер частиц: максимальное уменьшение на 50 %, увеличение не допускается (набивные колонки).

Размер колонки

– Длина колонки: ± 70 %;

– Внутренний диаметр колонки: ± 25 % *(набивные колонки)*, ± 50 % *(капиллярные колонки).*

Скорость потока: ± 50 %.

Температура: ± 5 %, если температура указана в нормативном документе.

Вводимый объём пробы. Может быть уменьшен при условии, что чувствительность фактически применяемой хроматографической системы и прецизионность системы в условиях повторяемости для определяемых соединений остаются удовлетворительными.

Хроматография на бумаге **ОФС.1.2.1.2.0002.15**

Хроматографический процесс, протекающий на листе фильтровальной бумаги при перемещении по ее капиллярам и поверхности подвижной фазы, называется хроматографией на бумаге.

Неподвижной фазой является либо сама бумага, либо вещества, предварительно нанесенные на ее волокна. Механизм хроматографии на бумаге может быть распределительным или адсорбционным. Перемещение подвижной фазы происходит либо только под действием капиллярных сил (восходящая хроматография), либо под действием капиллярных сил и силы тяжести (нисходящая хроматография).

При хроматографировании анализируемые вещества образуют на бумаге зоны адсорбции в виде круглых или овальных пятен или полос в зависимости от способа нанесения (в точку или полосой). Совокупность зон адсорбции, полученных при хроматографировании данного анализируемого образца, называется хроматограммой.

Подвижность вещества при хроматографировании характеризуется фактором удерживания R_f, (см. ОФС «Хроматография»).

Область применения

Бумажная хроматография может использоваться для установления подлинности, чистоты и количественного определения анализируемого вещества.

Подлинность подтверждается при одновременном хроматографировании на одном листе бумаги анализируемого и стандартного вещества. Если образцы идентичны, то соответствующие им зоны адсорбции на хроматограммах имеют одинаковый вид и равные значения R_f. Для идентификации иногда целесообразно хроматографировать смесь равных количеств анализируемого и стандартного вещества. На хроматограмме должно наблюдаться одно пятно, характеризующее зону адсорбции. Условия хроматографирования следует подбирать так, чтобы значения R_f были отличны от 0 и не превышали 1. Кроме того, для подтверждения подлинности анализируемого вещества могут быть использованы конкретные условия его детекции, указанные в фармакопейной статье.

При испытаниях на чистоту примеси и основное вещество должны иметь разные значения R_f. О степени чистоты анализируемого вещества можно судить по величине и интенсивности окраски (или поглощения) обнаруживаемых на хроматограмме зон адсорбции примесей. Содержание примесей может быть определено полуколичественно. Для этого на одном листе бумаги одновременно хроматографируют определенное количество анализируемого вещества и несколько образцов определяемой примеси (свидетеля) с различными, точно известными концентрациями. Содержание примеси в анализируемом образце оценивают, сравнивая ее зону адсорбции на хроматограмме по совокупности площади зоны адсорбции и интенсивности окраски (или поглощения) с зонами адсорбции свидетеля.

Для количественного анализа применяют специальные приборы, позволяющие проводить измерения в ультрафиолетовой и видимой областях спектра. Для обработки хроматограмм в видимой области спектра целесообразно использовать планшетные сканеры и соответствующее программное обеспечение.

Можно также проводить количественное определение веществ после их экстракции с хроматограммы. Для этого зоны адсорбции вырезают и экстрагируют определяемое вещество подходящим растворителем. Содержание анализируемого вещества в извлечении или сухом остатке после отгонки растворителя находят любым методом, пригодным для определения малых концентраций и учитывающим строение анализируемого вещества.

Проба испытуемой смеси может наноситься либо точечно на линию старта, либо в виде равномерной полосы вдоль всей линии старта, при этом первичная зона адсорбции будет иметь вид пятна, а во втором случае – полосы, параллельной линии старта.

Оборудование

Для проведения хроматографии на бумаге используют герметизированные камеры, изготовленные из инертного материала и позволяющие наблюдать за ходом процесса разделения при закрытой крышке камеры. Часто в качестве камер используют стеклянные стаканы или цилиндры с пришлифованной крышкой и дополнительно герметизированные. На крышке могут быть входные отверстия (шлюзы) для добавления растворителя или снятия избыточного давления в камере.

При проведении нисходящей хроматографии в верхней части камеры помещают сосуд для подвижной фазы (лодочку). Лодочка должна вмещать объем подвижной фазы, достаточный для проведения, по крайней мере, однократного хроматографирования. Длина лодочки должна превышать ширину листа хроматографической бумаги. Камера должна быть снабжена устройствами для закрепления листа хроматографической бумаги в рабочем положении и для ввода в лодочку подвижной фазы.

При проведении восходящей хроматографии подвижную фазу помещают либо в лодочку, установленную в нижней части камеры, либо наливают на дно камеры.

Внутренние стенки камеры обкладывают фильтровальной бумагой, что

способствует более быстрому и полному ее насыщению парами растворителей, входящих в состав подвижной фазы.

Подготовку оборудования, хроматографической бумаги и подвижной фазы приводят в фармакопейных статьях.

Методики хроматографического разделения

Бумажная хроматография может быть одномерной и двумерной.

Одномерная бумажная хроматография предполагает точечное нанесение или нанесение в виде полосы пробы исследуемой смеси на линию старта и последующее хроматографирование в одном направлении (рис. 1).

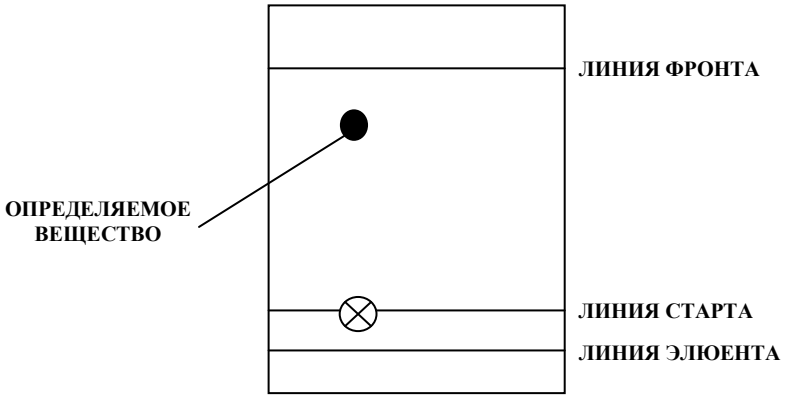


Рисунок 1 – Примерная схема одномерной бумажной хроматографии

Двумерная хроматография предполагает последовательное прохождение подвижной фазы в двух перпендикулярных направлениях, что позволяет обеспечить более четкое разделение смеси анализируемых веществ (рис. 2).

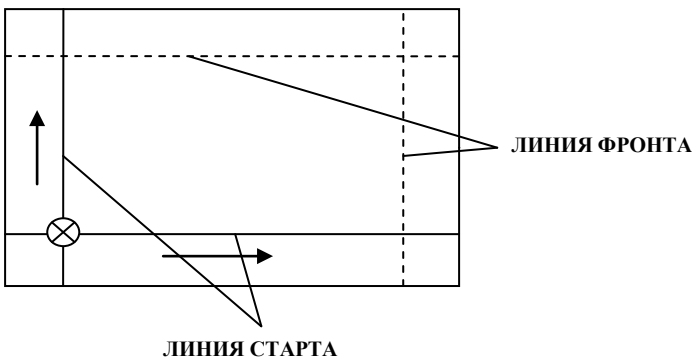


Рисунок 2 – Примерная схема двумерной бумажной хроматографии

Нисходящая хроматография

На дно хроматографической камеры помещают неподвижную или подвижную фазу в количестве, достаточном для образования слоя глубиной 2,5 см. Камеру закрывают и оставляют для насыщения на 24 ч при постоянной температуре. В отдельных случаях, при использовании достаточно летучих растворителей, это время может быть сокращено.

Растворы веществ наносят на линию старта микропипеткой или микрошприцем так, чтобы расстояние между точками нанесения отдельных проб было не менее 3 см. Если минимальное, необходимое для проведения хроматографирования количество анализируемого раствора может образовывать на бумаге первичную зону адсорбции в виде пятна, превышающего в диаметре 10 мм, нанесение проводят в несколько приемов, предотвращая путем подсушивания чрезмерную диффузию на линии старта. После нанесения растворов анализируемых веществ и высыхания образовавшейся при этом первичной хроматограммы полосу бумаги закрепляют в рабочем положении в камере и оставляют на 1,5 ч. В рабочем положении полоса хроматографической бумаги должна висеть вертикально так, чтобы между ее верхним концом, погруженным в лодочку, и линией старта был лишь один, по возможности плавный, перегиб. По окончании выдержки начинают хроматографирование, для чего в лодочку вливают подвижную фазу. Хроматографирование обычно заканчивают при приближении фронта подвижной фазы к нижнему концу полосы бумаги. Если в фармакопейной статье нет специальных указаний, полосу вынимают из камеры и сушат на воздухе, отметив графитовым карандашом конечное положение фронта подвижной фазы. Детекцию зон адсорбции осуществляют согласно указаниям фармакопейной статьи.

Восходящая хроматография

Для проведения восходящей хроматографии на бумаге используют камеры, в которых сосуд (лодочка) с подвижной фазой располагается в нижней части или на дне. Полоса хроматографической бумаги закрепляется в верхней части камеры так, чтобы обеспечить возможность погружения нижнего конца полосы в лодочку с подвижной фазой. В рабочем положении полосы линия старта должна отстоять от поверхности подвижной фазы на 2 – 3 см. В остальном приемы работы при проведении восходящей хроматографии на бумаге не отличаются от описанных выше.

Подготовка фаз и бумаги

При приготовлении несмешивающихся систем растворителей, совместно используемых при хроматографии в качестве подвижной и неподвижной фазы, необходимо обеспечить их взаимное насыщение, например, путем встряхивания в делительной воронке. При этом в фармакопейной статье должно быть указано, какую из фаз используют для хроматографирования.

Фильтровальную бумагу нужной плотности квалификации «для хроматографии» разрезают в направлении, перпендикулярном или параллельном волокнам, на листы (полосы), длина которых приблизительно равна высоте камеры. Ширина этих полос может быть приблизительно определена по формуле: $A = 3(K + 1)$, где A – ширина полосы (см), K – количество хроматограмм на полосе.

На каждой полосе бумаги для обозначения мест нанесения хроматографируемых веществ графитовым карандашом проводят прямую линию, называемую линией старта. Расстояние от конца полосы бумаги до линии старта выбирается так, чтобы при погружении бумаги в лодочку исключалось непосредственное соприкосновение нанесенных на линию старта веществ с жидкостью, находящейся в лодочке.

На приготовленные таким образом листы фильтровальной бумаги, если указано в фармакопейной статье, наносят неподвижную фазу. Для этого соответствующие труднолетучие растворители (формамид, пропиленгликоль и т.п.) смешивают с легколетучими растворителями и в полученную смесь на 1 – 2 с погружают подлежащие обработке листы бумаги. Избыток смеси с поверхности листов снимают, обжимая их между двумя слоями фильтровальной бумаги, после чего летучий компонент смеси удаляют высушиванием на воздухе в течение 15 – 20 мин.

Если в качестве неподвижной фазы рекомендован водный раствор нелетучих веществ, то бумагу обрабатывают этим раствором, сушат, как указано выше, а перед хроматографированием выдерживают в камере, содержащей пары воды. Нанесение на бумагу легколетучих компонентов неподвижных фаз осуществляется путем выдерживания ее в парах фазы в камере непосредственно перед хроматографированием.

Детекция зон адсорбции

По окончании хроматографирования хроматограммы подсушивают до удаления следов растворителей и просматривают в видимом или ультрафиолетовом свете (при определенной длине волны детектора, указанной в фармакопейной статье), отмечая при этом зоны адсорбции. В ряде случаев для обнаружения зон адсорбции хроматограмму подвергают обработке специальными реагентами, образующими с анализируемыми веществами окрашенные продукты реакции, путем опрыскивания или погружения в раствор реагента.

Способ детекции зон адсорбции должен быть обязательно указан в соответствующей фармакопейной статье на лекарственное средство.

Критерии оценки пригодности и пределы изменения параметров хроматографической системы, которые допустимы для выполнения условий пригодности. описаны в ОФС «Хроматография».

Тонкослойная хроматография	**ОФС.1.2.1.2.0003.15** **Взамен ГФ X** **Взамен ст. ГФ XI, вып.1**

Хроматографический процесс, протекающий при движении подвижной фазы в тонком слое сорбента, нанесенном на инертную твердую подложку (пластинку) из соответствующего материала – стекла, металла или полимера, называется тонкослойной хроматографией или хроматографией в тонком слое сорбента.

Тонкослойная хроматография (ТСХ) может использоваться для анализа как однокомпонентных, так и многокомпонентных лекарственных средств. В последнем случае подбираются условия хроматографирования, обеспечивающие разделение компонентов смеси.

Разделение может осуществляться по различным механизмам: адсорбционному, распределительному, ионообменному или какой-либо их комбинации.

Хроматографическое разделение осуществляется в результате движения анализируемых веществ в тонком слое (неподвижной фазе), растворенных в растворителе или соответствующей смеси растворителей (подвижная фаза, элюент). При разделении вещества образуют на поверхности сорбента зоны адсорбции в виде пятен (круглых или эллипсовидных) или полос.

Подвижность вещества при его хроматографировании характеризуется величинами R_f и R_{st} (см. ОФС «Хроматография»).

Параметры R_f и R_{st} используются для идентификации веществ и для оценки разделительной способности системы.

Область применения

ТСХ используется при испытаниях лекарственных средств на подлинность (идентификация анализируемых веществ), посторонние примеси (испытание на чистоту) полуколичественным и количественным методами.

Основные приборы и материалы

- пластинки с закрепленным слоем сорбента (неподвижной фазы) различных модификаций;
- хроматографические камеры;
- калиброванные капилляры и микрошприцы;
- устройства для нанесения на хроматограммы обнаруживающих реагентов (пульверизаторы для опрыскивания, камеры для погружения хроматограмм в раствор и др.);
- стандартные образцы, растворители, реагенты для обнаружения хроматографических зон;
- ультрахемископы с УФ-лампами на 254 и 365 нм;
- системы обработки и хранения данных.

Используемая лампа должна удовлетворять следующим требованиям теста.

Проверка работы лампы. На пластинку силикагель G наносят 5 мкл 0,04 % раствора натрия салицилата в спирте 96 % для ламп с максимумом излучения при 254 нм или 5 мкл 0,2 % раствора натрия салицилата в спирте 96 % для ламп с максимумом излучения при 365 нм в виде пятна диаметром около 5 мм; пятно должно светиться. Проверка работы ламп проводится не реже одного раза в три месяца, а также при возникновении сомнений в правильности работы лампы с учетом срока её эксплуатации.

При проведении анализов расстояние между лампой и хроматографической пластинкой не должно превышать расстояния, используемого при проверке работы лампы.

Примечание. Используемый спирт должен быть свободен от флуоресцирующих веществ.

Хроматографические пластинки

Пластинка для ТСХ представляет собой твердую подложку (стеклянную, металлическую или полимерную) с нанесенным слоем сорбента. Толщина слоя сорбента от 0,10 до 0,25 мм для аналитического варианта и от 0,5 до 2,0 мм для препаративного.

В качестве сорбента в пластинках для ТСХ чаще всего используются: алюминия оксид, модифицированный и немодифицированный силикагель, модифицированная и немодифицированная целлюлоза.

Готовые хроматографические пластинки могут содержать флуоресцентный индикатор для детектирования веществ, поглощающих в ультрафиолетовой области спектра при 254 и 365 нм.

Размер частиц сорбента для классического аналитического варианта ТСХ составляет 10 – 20 мкм. Наряду с такими пластинками можно использовать пластинки для высокоэффективной тонкослойной хроматографии, содержащие сорбент с частицами размером 5 – 7 мкм. Такие пластинки позволяют увеличить эффективность разделения и уменьшить предел обнаружения.

Выпускаются также пластинки с монолитными сорбентами и пластинки с концентрирующей зоной (двухфазовые пластинки). Последние используются в фармацевтическом анализе для разделения сложных и гетерогенных смесей (экстракты из лекарственного растительного сырья, растворы таблеток со вспомогательными компонентами, мягкие лекарственные формы, смеси, содержащие пигменты, суспензии и др.).

Предварительная подготовка пластинок. В некоторых случаях перед хроматографированием предусмотрена предварительная обработка

пластинок. Это может быть предварительное хроматографирование чистых пластинок в соответствующем растворителе, импрегнирование пластинок при помощи опрыскивания, погружения или элюирования. При необходимости перед использованием пластинки активируют нагреванием в сушильном шкафу в течение 1 ч при температуре 100 – 105 °С. Описание предварительной обработки пластинок должно быть приведено в фармакопейной статье.

Хроматографические камеры

Используют хроматографические камеры для вертикального или горизонтального элюирования с герметичными крышками. Камеры для горизонтального элюирования снабжены также устройствами для подачи подвижной фазы на пластинку. Использование камеры для горизонтального элюирования позволяет осуществлять одновременное элюирование с противоположных сторон пластинки, что увеличивает производительность анализа в два раза по сравнению с использованием камеры для вертикального элюирования. При этом также уменьшается расход подвижной фазы приблизительно в 10 раз. В горизонтальной камере движение подвижной фазы по пластинке происходит только за счет капиллярных сил, вклад гравитации при этом отсутствует, что повышает эффективность разделения по сравнению с камерами для вертикального элюирования.

Подвижные фазы

Подвижные фазы (элюенты) должны быть предпочтительно малотоксичными, содержать минимум компонентов, не вступать в химические реакции ни с сорбентом (неподвижной фазой), ни с компонентами разделяемой смеси. Подвижные фазы должны также достаточно быстро испаряться с поверхности хроматограмм после элюирования.

Для подавления диссоциации полярных молекул компонентов разделяемой смеси к подвижной фазе добавляют вещества кислого или

основного характера (модификаторы).

Нанесение проб

Нанесение проб осуществляют:

– калиброванными капиллярами с тупым концом;

– поршневыми микрошприцами с тупым концом иглы;

– полуавтоматическими или автоматическими приборами для нанесения образцов.

Нанесение осуществляют двумя способами: в виде пятен 2 – 5 мм диаметром (1 – 2 мм на высокоэффективных пластинках) с промежутками между пятнами не менее 10 мм и в виде полос длиной 10 – 20 мм (5 – 10 мм на высокоэффективных пластинках) с промежутком между ними не менее 10 мм. Расстояние до линии старта от нижнего края пластинки должно составлять не менее 10 мм. Если в методике фармакопейной статьи предусмотрено использование как обычных, так и высокоэффективных пластинок, условия для высокоэффективных пластинок должны быть указаны в квадратных скобках. Расстояния на стартовой линии от боковых краев пластинки до мест нанесения первой и последней проб должны составлять не менее 10 мм. В процессе нанесения проб недопустимо повреждение сорбента на линии старта. Подсушивание нанесенных проб осуществляют в токе холодного или теплого воздуха, либо на специальном столе с электроподогревом.

Способы элюирования

Используют следующие способы элюирования: восходящее элюирование (одно- и многоступенчатое, одномерное и двумерное – с поворотом пластинки на 90° или 180°) и горизонтальное.

Восходящая хроматография

Если не указано иначе в фармакопейной статье, пластинку с нанесенными пробами помещают вертикально в камеру. При необходимости камеру предварительно насыщают парами подвижной фазы (в этом случае в

фармакопейной статье должно быть указано время насыщения). Для этого перед проведением анализа обычно внутренние стенки камеры обкладывают фильтровальной бумагой, смоченной подвижной фазой. Уровень подвижной фазы должен быть расположен ниже линии старта. Камеру закрывают и проводят процесс при 20 – 25 °С в защищенном от света месте. После прохождения фронтом подвижной фазы расстояния, указанного в нормативном документе, пластинку вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей, проявляют и детектируют зоны адсорбции указанным способом.

При проведении двумерной хроматографии пластинку сушат после хроматографирования в первом направлении и хроматографируют в направлении, перпендикулярном первому.

Горизонтальная хроматография

Пластинку с нанесенными пробами помещают в камеру и направляют поток подвижной фазы из лотка в камеру согласно инструкции к прибору для горизонтального элюирования. Процесс проводят при 20 – 25 °С (если это указано в фармакопейной статье, одновременно с противоположных сторон пластинки). Когда подвижная фаза пройдет расстояние, указанное в нормативном документе, пластинку вынимают, сушат до удаления следов растворителей, проявляют и детектируют зоны адсорбции указанным способом.

Двухмерную хроматографию выполняют, как указано в разделе «Восходящая хроматография».

ВИЗУАЛЬНАЯ ОЦЕНКА

Обнаружение (детектирование) зон адсорбции после проведения качественной и полуколичественной ТСХ осуществляют следующими способами:

- в видимом и ультрафиолетовом свете (при определенной длине волны);
- опрыскиванием растворами обнаруживающих реагентов;
- выдерживанием в парах обнаруживающего реагента;

– погружением в растворы обнаруживающих реагентов с использованием для этих целей специальных камер.

Идентификация. Испытание на подлинность (идентификация) анализируемых веществ проводится при одновременном хроматографировании одинакового количества анализируемого вещества и стандартного образца на одной и той же хроматографической пластинке. Основную зону адсорбции (пятно или полосу) на хроматограмме испытуемого раствора сравнивают с основной зоной адсорбции (пятном или полосой) на хроматограмме стандартного раствора (раствора сравнения), сравнивая окраску (цвет флуоресценции), размер и величину фактора R_f соответствующих зон адсорбции (ОФС «Хроматография»).

Испытание на посторонние примеси. При испытаниях на чистоту основное вещество и примеси в условиях хроматографирования должны иметь разные значения R_f. При этом о степени чистоты анализируемого вещества можно судить по величине и интенсивности зон адсорбции обнаруживаемых на хроматограмме примесей. Их содержание может быть определено полуколичественно. Для этого на пластинку наносят определенные количества анализируемого вещества и свидетелей. Для определения идентифицированных примесей в качестве свидетелей используют стандартные образцы идентифицированных примесей в количествах, соответствующих их предельно допустимому содержанию. Для определения неидентифицированных примесей чаще всего используют растворы сравнения, приготовленные путем разведения испытуемого раствора. Содержание примеси в анализируемом лекарственном средстве оценивают, сравнивая зону адсорбции примеси по совокупности величины и интенсивности поглощения или окраски с соответствующими зонами адсорбции на хроматограмме свидетелей. Дополнительное пятно (пятна) на хроматограмме испытуемого раствора сравнивают визуально с дополнительным пятном (пятнами) на хроматограмме стандартного раствора,

содержащего примесь (примеси), или с пятном на хроматограмме раствора сравнения, приготовленного из разбавленного испытуемого раствора.

Проверка разделительной способности хроматографической системы. Требования к проверке разделительной способности приводят в фармакопейной статье.

Проверка определения предела обнаружения определяемых примесей. Чувствительность считается удовлетворительной, если зона адсорбции четко обнаруживается на хроматограмме наиболее разбавленного стандартного раствора примеси или раствора сравнения.

КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ИЗМЕРЕНИЯ

Если вещества, разделяемые методом ТСХ реагируют на излучение в ультрафиолетовой или видимой области спектра, их можно количественно определить непосредственно на пластинке, используя соответствующее оборудование. Для этого измеряют интенсивность отраженного света, передвигая пластинку или регистрирующее устройство вдоль оси хроматограммы. Аналогичным образом можно измерять флуоресценцию.

Вещества, содержащие радионуклиды, могут быть количественно определены непосредственно на пластинке с использованием соответствующего счетчика радиоактивных веществ, а также удалением неподвижной фазы в районе зон адсорбции и измерением радиоактивности с использованием жидкостного сцинциляционного счетчика.

Оборудование. Для проведения количественных измерений непосредственно на хроматографической пластинке оборудование содержит:

- полуавтоматическое или автоматическое устройство для точного и воспроизводимого нанесения необходимого количества вещества в определенном месте пластинки;
- фотометр (денситометр), способный перемещать пластику или измерительное устройство вдоль осей «*x*» и «*y*», с источником монохроматического излучения для измерения отражения или

пропускания; в том случае, когда измеряется флуоресценция, требуется дополнительный монохроматический фильтр для выбора соответствующей спектральной области излучаемого света; полученные в результате денситограммы обрабатывают в соответствии с методом обработки хроматограмм, описанным в ОФС «Хроматография».

Критерии оценки пригодности системы описаны в ОФС «Хроматография». В этой же ОФС приводятся пределы изменения параметров хроматографической системы, которые допустимы для выполнения условий пригодности.

Высокоэффективная тонкослойная хроматография

Эффективность разделения увеличивается как вследствие увеличения площади раздела подвижной и неподвижной фазы за счет уменьшения диаметра частиц сорбента, так и благодаря большей однородности размеров этих частиц. Применяют пластинки для высокоэффективной тонкослойной хроматографии, выполненные как в нормально-фазовом (полярная неподвижная фаза), так и в обращенно-фазовом (неполярная неподвижная фаза) вариантах.

По сравнению с классической ТСХ использование высокоэффективных пластинок позволяет:

– увеличить число анализируемых проб за счет уменьшения размеров зон адсорбции первичной хроматограммы: диаметра пятен (до 1 – 2 мм) или длины полос (до 5 – 10 мм);

– значительно увеличить разделительную способность системы;

– снизить пределы обнаружения и количественного определения анализируемых веществ в 10 – 100 раз.

Применение высокоэффективной тонкослойной хроматографии обеспечивает получение более компактных зон адсорбции разделяемых соединений, что улучшает метрологические характеристики количественного определения с помощью сканирующей хроматоденситометрии.

Газовая хроматография **ОФС.1.2.1.2.0004.15**

Газовая хроматография – это метод разделения летучих соединений, основанный на различии в распределении компонентов анализируемой смеси в системе несмешивающихся и движущихся относительно друг друга фаз, где в качестве подвижной фазы выступает газ (газ-носитель), а в качестве неподвижной фазы - твердый сорбент или жидкость, нанесенная на твердый носитель или внутренние стенки колонки.

Область применения

В фармацевтическом анализе газовая хроматография используется для оценки чистоты, установления подлинности и количественного определения лекарственных средств в тестах «Посторонние примеси», «Однородность дозирования», «Растворение», «Количественное определение», «Остаточные органические растворители» и др.

Оборудование

Газовый хроматограф состоит из устройства ввода пробы (инжектора), термостата с хроматографической колонкой, детектора и системы сбора и обработки данных. Газ-носитель из баллона под давлением проходит через устройство ввода пробы, колонку, а затем через детектор.

Хроматографирование проводится при постоянной температуре или в соответствии с заданной температурной программой.

Устройство ввода пробы

Ввод жидкой пробы осуществляется с помощью шприца, как непосредственно в колонку, так и в испарительную камеру, которая может быть оснащена делителем потока.

Ввод газовой фазы осуществляется с помощью оборудования для статического или динамического парофазного анализа. Парофазный анализ (head-space) позволяет повысить чувствительность определения летучих соединений.

В *статическом парофазном анализе* в термостатируемую камеру помещается герметично закрытый сосуд, содержащий твердый или жидкий образец пробы, и нагревается в течение определенного периода времени для достижения равновесия между двумя фазами. После достижения равновесия из сосуда отбирается определенный объем газовой фазы и вводится в испаритель хроматографа.

В динамическом парофазном анализе (стриппинг) через образец пробы в течение определенного времени пропускается инертный газ. Летучие компоненты выдуваются из образца пробы и концентрируются на сорбенте, находящемся в ловушке. После этого ловушка быстро нагревается, и летучие компоненты переносятся потоком инертного газа в хроматографическую колонку.

Колонки

Используются несколько типов аналитических колонок: насадочные (набивные), микронасадочные, капиллярные, поликапиллярные.

Насадочные колонки изготавливаются из металла (нержавеющая сталь), стекла, фторопласта, которым придается спиральная форма. Внутренний диаметр насадочных колонок составляет от 2 до 4 мм, а длина – от 0,5 до 4–5 м.

Скорость газа-носителя может устанавливаться в пределах от 10 до 60 мл/мин.

Микронасадочные колонки отличаются от насадочных колонок только диаметром трубок, равным 0,5–1,0 мм. Длина таких колонок обычно от 0,5 до 2 м.

Капиллярные колонки изготавливаются из плавленого кварца или металла. Внутренний диаметр составляет от 0,10 мм до 0,53 мм, длина от 5 м до 200 м, толщина неподвижной жидкой фазы от 0,1 мкм до 5,0 мкм

Скорость газа-носителя может устанавливаться в пределах от 1 до 5 мл/мин.

Поликапиллярные колонки представляют собой пакеты параллельно работающих капилляров, внутренний диаметр которых составляет около 40 мкм, длина до 1м, общим числом до 1000 и более.

Неподвижные фазы

Газовую хроматографию можно подразделить на два вида: газоадсорбционную и газожидкостную хроматографии. В фармацевтическом анализе наибольшее распространение находит газожидкостная хроматография.

В *газоадсорбционной хроматографии* в качестве сорбентов (адсорбентов) используются неорганические (силикагель, графитированная термическая сажа, молекулярные сита – алюмосиликаты натрия и кальция) и полимерные пористые сорбенты.

В *газожидкостной хроматографии* неподвижная фаза (абсорбент) представляет собой жидкость, нанесенную на твердый носитель. Носитель – относительно инертный адсорбент с низкой удельной поверхностью, на которой должна удерживаться неподвижная фаза в виде пленки равномерной толщины. Применяют минеральные и полимерные носители. Большинство минеральных носителей представляют собой переработанные диатомиты. Обычно используются носители с размерами частиц в интервалах от 125 до 150 мкм или от 150 до 180 мкм.

В капиллярных колонках слой сорбента наносится на внутреннюю поверхность капилляра в виде слоя жидкой неподвижной фазы или в виде слоя адсорбента, роль которого чаще всего выполняет полимерная пленка.

Подвижная фаза

В качестве подвижной фазы используются азот, гелий, аргон или водород. Эти газы-носители могут подаваться в систему либо из баллонов, либо из газогенераторов, позволяющих получать газ высокой чистоты.

Детекторы

Для газовой хроматографии предложено большое количество детекторов: пламенно-ионизационный детектор (ПИД), детектор по теплопроводности (катарометр), термоионный (ТИД), электронно-захватный (ЭЗД), масс-спектрометрический и др.

Выбор детектора определяется основными характеристиками (чувствительность, предел детектирования, линейность, быстродействие и селективность), которые в наибольшей степени соответствуют цели анализа и условиям его проведения.

В силу универсальности, превосходных характеристик и высоких эксплуатационных качеств, наибольшее распространение в анализе лекарственных средств получили пламенно-ионизационный детектор и детектор по теплопроводности.

Метод

Анализ в газовой хроматографии проводится в соответствии с установленными параметрами хроматографической системы. Совокупность этих параметров называется методом.

В описании метода должны быть указаны: тип детектора, тип колонки (насадочная или капиллярная), материал и геометрические параметры колонки, сорбент (тип твердого носителя и его характеристики, неподвижная жидкая фаза и ее количество), метод введения пробы и его параметры, температура испарителя, колонки и детектора, газ-носитель и его расход.

Оценка хроматографического разделения проводится на основании теста пригодности хроматографической системы приведенного в фармакопейной статье.

Для достижения соответствия требованиям пригодности хроматографической системы возможно изменение некоторых параметров в установленных пределах, указанных в ОФС «Хроматография».

Высокоэффективная жидкостная хроматография	**ОФС.1.2.1.2.0005.15**

Высокоэффективная жидкостная хроматография (жидкостная хроматография высокого давления) – это метод колоночной хроматографии, в котором подвижной фазой служит жидкость, движущаяся через хроматографическую колонку, заполненную неподвижной фазой (сорбентом). Колонки для высокоэффективной жидкостной хроматографии характеризуются высоким гидравлическим сопротивлением на входе.

В зависимости от механизма разделения веществ различают следующие варианты высокоэффективной жидкостной хроматографии: адсорбционную, распределительную, ионообменную, эксклюзионную, хиральную и др. в соответствии с характером основных проявляющихся межмолекулярных взаимодействий. В адсорбционной хроматографии разделение веществ происходит за счет их различной способности адсорбироваться и десорбироваться с поверхности сорбента с развитой поверхностью, например, силикагеля. В распределительной высокоэффективной жидкостной хроматографии разделение происходит за счет различия коэффициентов распределения разделяемых веществ между неподвижной (как правило, химически привитой к поверхности неподвижного носителя) и подвижной фазами.

В зависимости от типа подвижной и неподвижной фазы различают нормально-фазовую и обращенно-фазовую хроматографию. В нормально-

фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии неподвижная фаза – полярная (чаще всего силикагель или силикагель с привитыми NH_2- или CN-группами и др.), а подвижная фаза – неполярная (гексан, либо смеси гексана с более полярными органическими растворителями – хлороформом, спиртами и т.д.). Удерживание веществ растет с увеличением их полярности. В нормально-фазовой хроматографии элюирующая способность подвижной фазы увеличивается с ростом ее полярности.

В обращенно-фазовой хроматографии неподвижная фаза – неполярная (гидрофобные силикагели с привитыми группами С4, С8, С18 и др.); подвижная фаза – полярная (смеси воды и полярных растворителей: ацетонитрила, метанола, тетрагидрофурана и др.). Удерживание веществ растет с увеличением их гидрофобности (неполярности). Чем больше содержание органического растворителя, тем выше элюирующая способность подвижной фазы.

В ионообменной хроматографии молекулы веществ смеси, диссоциированные в растворе на катионы и анионы, разделяются при движении через сорбент (катионит или анионит) за счет различной силы взаимодействия определяемых ионов с ионными группами сорбента.

В эксклюзионной (ситовой, гель-проникающей, гель-фильтрационной) хроматографии молекулы веществ разделяются по размеру за счет их разной способности проникать в поры неподвижной фазы. При этом первыми из колонки выходят наиболее крупные молекулы, способные проникать в минимальное число пор неподвижной фазы, а последними выходят вещества с малыми размерами молекул.

В хиральной хроматографии происходит разделение оптически активных соединений на отдельные энантиомеры. Разделение может осуществляется на хиральных неподвижных фазах или на ахиральных неподвижных фазах с использованием хиральных подвижных фаз.

Существуют и другие варианты высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Часто разделение протекает не по одному, а по нескольким механизмам одновременно, в зависимости от типа подвижной и неподвижной фаз, а также природы определяемого соединения.

Область применения

Высокоэффективная жидкостная хроматография успешно применяется как для качественного, так и для количественного анализа лекарственных средств в испытаниях «Подлинность», «Посторонние примеси», «Растворение», «Однородность дозирования», «Количественное определение». Следует отметить, что хроматография позволяет совмещать в одной пробе несколько испытаний, в том числе «Подлинность» и «Количественное определение».

Оборудование

Для проведения анализа используют соответствующие приборы – жидкостные хроматографы.

В состав жидкостного хроматографа обычно входят следующие основные узлы:

- узел подготовки подвижной фазы, включая емкость с подвижной фазой (или емкости с отдельными растворителями, входящими в состав подвижной фазы) и систему дегазации подвижной фазы;
- насосная система;
- смеситель подвижной фазы (при необходимости);
- система ввода пробы (инжектор), может быть ручным или автоматическим (автосамплер);
- хроматографическая колонка (может быть установлена в термостате);
- детектор (один или несколько с разными способами детектирования);
- система управления хроматографом, сбора и обработки данных.

Помимо этого в состав хроматографа могут входить: система пробоподготовки и предколоночный реактор, система переключения колонок, постколоночный реактор и другое оборудование.

Насосная система

Насосы обеспечивают подачу подвижной фазы в колонку с заданной скоростью. Состав подвижной фазы и скорость потока могут быть постоянными или меняющимся во время анализа. В случае постоянного состава подвижной фазы процесс называют изократическим, а во втором – градиентным. Современная насосная система жидкостного хроматографа состоит из одного или нескольких насосов, управляемых компьютером. Это позволяет менять состав подвижной фазы по определенной программе при градиентном элюировании. Насосы для аналитической высокоэффективной жидкостной хроматографии позволяют поддерживать скорость подачи подвижной фазы в колонку в интервале от 0,1 до 10 мл/мин при давлении на входе в колонку до 40 МПа. Пульсации давления минимизируются специальными демпферными системами, входящими в конструкцию насосов. Рабочие детали насосов изготавливаются из коррозионностойких материалов, что позволяет использовать в составе подвижной фазы агрессивные компоненты.

Смесители

В смесителе происходит образование единой подвижной фазы из отдельных растворителей, подаваемых насосами, если необходимая смесь не была приготовлена заранее. Смешение компонентов подвижной фазы в смесителе может происходить как при низком давлении (до насосов), так и при высоком давлении (после насосов). Смеситель можно использовать для подготовки подвижной фазы и при изократическом элюировании.

Объем смесителя может влиять на время удерживания компонентов при градиентном элюировании.

Инжекторы

Инжекторы могут быть универсальными, с возможностью изменения объема вводимой пробы, или дискретными для ввода пробы только определенного объема. Оба типа инжекторов могут быть автоматическими («автоинжекторы» или «автосэмплеры»). Инжектор для ввода пробы (раствора) расположен непосредственно перед хроматографической колонкой. Конструкция инжектора позволяет изменять направление потока подвижной фазы и осуществлять предварительное введение пробы в петлю-дозатор определенного объема (обычно от 10 до 100 мкл) или в специальное дозирующее устройство переменного объема. Объем петли указан на ее маркировке. Конструкция дискретного инжектора, как правило, позволяет осуществлять замену петли. Современные автоматические инжекторы могут обладать рядом дополнительных функций, например, выполнять функцию станции пробоподготовки: осуществлять смешение и разбавление образцов, проводить реакцию предколоночной дериватизации.

Хроматографическая колонка

Хроматографические колонки обычно представляют собой трубки из нержавеющей стали, стекла или пластика, заполненные сорбентом и закрытые с обеих сторон фильтрами с диаметром пор 2–5 мкм. Длина аналитической колонки может находиться в диапазоне от 5 до 60 см и более, внутренний диаметр – от 2 до 10 мм. Колонки с внутренним диаметром менее 2 мм используются в микроколоночной хроматографии. Существуют также капиллярные колонки с внутренним диаметром около 0,3–0,7 мм. Колонки для препаративной хроматографии могут иметь внутренний диаметр 50 мм и более.

Перед аналитической колонкой могут устанавливаться короткие колонки (предколонки), выполняющие различные вспомогательные функции, основная из которых – защита аналитической колонки. Обычно анализ проводят при комнатной температуре, однако для увеличения эффективности разделения и сокращения продолжительности анализа может быть использовано термостатирование колонок при температурах до 80 - 100 °C.

Возможность использования повышенной температуры при разделении ограничивается стабильностью неподвижной фазы, поскольку при повышенных температурах возможна ее деструкция.

Неподвижная фаза (сорбент)

В качестве сорбентов обычно применяются:

– силикагель, оксид алюминия, используются в нормально-фазовой хроматографии. Механизм удерживания в данном случае – обычно адсорбция;

– силикагель, смолы или полимеры с привитыми кислотными или основными группами. Область применения – ионообменная и ионная хроматография;

– силикагель или полимеры с заданным распределением размеров пор (эксклюзионная хроматография);

– химически модифицированные сорбенты (сорбенты с привитыми фазами), приготовленные чаще всего на основе силикагеля. Механизм удерживания – адсорбция или распределение между подвижной и неподвижной фазами. Область применения зависит от типа привитых функциональных групп. Некоторые типы сорбентов могут использоваться как в обращенной, так и в нормально фазовой хроматографии;

– химически модифицированные хиральные сорбенты, например, производные целлюлозы и амилозы, протеины и пептиды, циклодекстрины, хитозаны, используемые для разделения энантиомеров (хиральная хроматография).

Сорбенты с привитыми фазами могут иметь различную степень химической модификации. В качестве привитых фаз наиболее часто применяются:

– октадецильные группы [Si-$(CH_2)_{17}$-CH_3] (сорбент октадецилсилан (ODS) или C_{18});

– октильные группы [Si-$(CH_2)_7$-CH_3] (сорбент октилсилан или C_8);

– фенильные группы [Si-$(CH_2)_n$-(C_6H_5)] (сорбент фенилсилан);

– цианопропильные группы [Si-$(CH_2)_3$-CN] (сорбент CN);

– аминопропильные группы [Si-$(CH_2)_3$-NH_2] (сорбент NH_2);

– диольные группы [Si-$(CH_2)_3$-OCH(OH)-CH_2-OH] (сорбент диол).

Наиболее часто анализ выполняют на неполярных привитых фазах в обращенно-фазовом режиме с применением сорбента C_{18}.

Сорбенты с привитыми фазами, полученные на основе силикагеля, химически устойчивы при значениях pH от 2,0 до 7,0, если другое специально не оговаривается производителем. Частицы сорбента могут иметь сферическую или неправильную форму и разнообразную пористость. Размер частиц сорбента в аналитической высокоэффективной жидкостной хроматографии обычно составляет 3–10 мкм, в препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии – 50 мкм и более. Существуют также монолитные колонки, в которых сорбент представляет собой монолит со сквозными порами, заполняющий весь объем колонки.

Высокая эффективность разделения обеспечивается высокой площадью поверхности частиц сорбента (которая является следствием их микроскопических размеров и наличия пор), а также равномерностью состава сорбента и плотной и равномерной его упаковкой.

Детекторы

В высокоэффективной жидкостной хроматографии используются различные способы детектирования. В общем случае подвижная фаза с растворенными в ней компонентами после хроматографической колонки попадает в ячейку детектора, где непрерывно измеряется то или иное ее свойство (поглощение в ультрафиолетовой или видимой области спектра, флуоресценция, показатель преломления, электропроводность и др.). Полученная при этом хроматограмма представляет собой график зависимости некоторого физического или физико-химического параметра подвижной фазы от времени.

Наиболее распространенными детекторами в высокоэффективной жидкостной хроматографии являются **спектрофотометрические**. В процессе

элюирования веществ в специально сконструированной микрокювете измеряется оптическая плотность элюата при заранее выбранной длине волны. Широкая область линейности детектора позволяет анализировать как примеси, так и основные компоненты смеси на одной хроматограмме. Спектрофотометрический детектор позволяет проводить детектирование при любой длине волны в его рабочем диапазоне (как правило, 190-600 нм). Применяются также мультиволновые детекторы, позволяющие проводить детектирование при нескольких длинах волн одновременно и детекторы на диодной матрице, позволяющие регистрировать оптическую плотность одновременно во всем рабочем диапазоне длин волн (как правило, 190-950 нм). Это позволяет регистрировать спектры поглощения проходящих через ячейку детектора компонентов.

Флуориметрический детектор применяется для определения флуоресцирующих соединений или не флуоресцирующих соединений в виде их флуоресцирующих производных. Принцип действия **флуориметрического** детектора основан на измерении флуоресцентного излучения поглощенного света. Поглощение обычно проводят в ультрафиолетовой области спектра, длины волн флуоресцентного излучения превышают длины волн поглощенного света. Флуориметрические детекторы обладают очень высокой чувствительностью и селективностью. Чувствительность флуоресцентных детекторов примерно в 1000 раз выше чувствительности спектрофотометрических. Современные флуоресцентные детекторы позволяют не только получать хроматограммы, но и регистрировать спектры возбуждения и флуоресценции анализируемых соединений.

Для определения соединений, слабо поглощающих в ультрафиолетовой и видимой областях спектра (например углеводов), используют **рефрактометрические** детекторы (рефрактометры). Недостатки этих детекторов – их низкая (по сравнению со спектрофотометрическими детекторами) чувствительность и значительная температурная зависимость

интенсивности сигнала (детектор необходимо термостатировать), а также невозможность их использование в режиме градиентного элюирования.

Принцип работы **испарительных детекторов лазерного светового рассеяния** основан на различии давлений паров хроматографических растворителей, входящих в состав подвижной фазы, и анализируемых веществ. Подвижная фаза на выходе из колонки вводится в распылитель, смешивается с азотом или CO_2 и в виде мелкодисперсного аэрозоля попадает в обогреваемую испарительную трубку с температурой 30 – 160 °С, в которой подвижная фаза испаряется. Аэрозоль из нелетучих частиц анализируемых веществ рассеивает световой поток в камере рассеивания. По степени рассеивания светового потока можно судить о количестве определяемого соединения. Детектор более чувствителен, чем рефрактометрический, его сигнал не зависит от оптических свойств пробы, от типа функциональных групп в определяемых веществах, от состава подвижной фазы и может быть использован в режиме градиентного элюирования.

Электрохимические детекторы (кондуктометрические, амперометрические, кулонометрические и др.). **Амперометрический** детектор применяют для определения электроактивных соединений, которые могут быть окислены или восстановлены на поверхности твердого электрода. Аналитическим сигналом является величина тока окисления или восстановления. В ячейке детектора имеется по крайне мере два электрода – рабочий и электрод сравнения (хлоридсеребрянный или стальной). К электродам прикладывается рабочий потенциал, величина которого зависит от природы определяемых соединений. Измерения могут проводиться как при постоянном потенциале, так и в импульсном режиме, когда задается профиль изменения потенциала рабочего электрода в течении одного цикла регистрации сигнала. В амперометрическом детекторе используют рабочие электроды из углеродных материалов (наиболее часто стеклоуглеродный или графитовый), и металлические: платиновый, золотой, медный, никелевый.

Кондуктометрический детектор используют для детектирования анионов и катионов в ионной хроматографии. Принцип его работы основан на измерении электропроводности подвижной фазы в процессе элюирования вещества.

Исключительно информативным является **масс-спектрометрический** детектор, который обладает высокой чувствительностью и селективностью. Последние модели масс-спектрометров для жидкостной хроматографии работают в диапазоне масс m/z от 20 до 4000 а.е.м.

В высокоэффективной жидкостной хроматографии используются также, Фурье-ИК-детекторы, радиоактивности и некоторые другие.

Система сбора и обработки данных

Современная система обработки данных представляет собой сопряженный с хроматографом персональный компьютер с установленным программным обеспечением, позволяющим регистрировать и обрабатывать хроматограмму, а также управлять работой хроматографа и следить за основными параметрами хроматографической системы.

Подвижная фаза

Подвижная фаза в высокоэффективной жидкостной хроматографии выполняет двоякую функцию: обеспечивает перенос десорбированных молекул по колонке и регулирует константы равновесия, а, следовательно, и удерживание в результате взаимодействия с неподвижной фазой (сорбируясь на поверхности) и с молекулами разделяемых веществ. Таким образом, изменяя состав подвижной фазы в высокоэффективной жидкостной хроматографии можно влиять на времена удерживания соединений, селективность и эффективность их разделения.

Подвижная фаза может состоять из одного растворителя, часто из двух, при необходимости – из трех и более. Состав подвижной фазы указывают как объемное соотношение входящих в нее растворителей. В отдельных случаях может указываться массовое соотношение, что должно быть специально оговорено. В качестве компонентов подвижной фазы могут быть

использованы буферные растворы с определенным значением pH, различные соли, кислоты и основания и другие модификаторы.

В нормально-фазовой хроматографии обычно применяются жидкие углеводороды (гексан, циклогексан, гептан) и другие относительно неполярные растворители с небольшими добавками полярных органических соединений, которые регулируют элюирующую силу подвижной фазы.

В обращено-фазовой хроматографии в качестве подвижной фазы используется вода или водно-органические смеси. Органическими добавками обычно служат полярные органические растворители (ацетонитрил и метанол). Для оптимизации разделения могут использоваться водные растворы с определенным значением pH, в частности буферные раствор, а также различные добавки в подвижную фазу: фосфорная и уксусная кислоты при разделении соединений кислотного характера; аммиак и алифатические амины при разделении соединений основного характера, и другие модификаторы.

На хроматографический анализ большое влияние оказывает степень чистоты подвижной фазы, поэтому предпочтительно применять растворители, выпущенные специально для жидкостной хроматографии (включая воду).

При использовании УФ-спектрофотометрического детектора подвижная фаза не должна иметь выраженного поглощения при выбранной для детектирования длине волны. Предел прозрачности или оптическая плотность при определенной длине волны растворителя конкретного изготовителя часто указывается на упаковке.

Подвижная фаза и анализируемые растворы не должны содержать нерастворившиеся частиц и пузырьки газа. Воду, полученную в лабораторных условиях, водные растворы, предварительно смешанные с водой органические растворители, а также анализируемые растворы необходимо подвергать тонкой фильтрации и дегазации. Для этих целей обычно применяют фильтрование под вакуумом через инертный по

отношению к данному растворителю или раствору мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм

Перечень условий хроматографирования, подлежащих указанию

В фармакопейной статье должны быть приведены: размеры колонки (длина и внутренний диаметр), типа сорбента с указанием размера частиц, размера пор, температура колонки (если необходимо термостатирование), объем вводимой пробы (объем петли), состав подвижной фазы и способ ее приготовления, скорость подачи подвижной фазы, тип детектора и условия детектирования (при необходимости параметры используемой ячейки детектора), описание градиентного режима (если используется), включающее в себя стадию переуравновешивания к исходным условиям, время хроматографирования, подробное описание методики и формулы расчета, описания приготовления стандартных и испытуемых растворов.

В случае использования предколоночной дериватизации в автосамплере приводится информацию о программе работы автосамплера. В случае использования постколоночной дериватизации указывается скорость подачи дериватизирующего реагента, объем петли смешения и ее температура.

МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ВИДЫ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Ион-парная хроматография

Одной из разновидностей обращено-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии является ион парная хроматография – позволяющая определять ионизированные соединения. Для этого в состав традиционной обращено-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии подвижной фазы добавляют гидрофобные органические соединения с ионогенными группами (ион парные реагенты). Для разделения оснований обычно используют алкилсульфаты натрия, для разделения кислот применяют соли тетраалкиламмония (тетрабутиламмония фосфат, цетилтриметиламмония бромид и др.). В ион-парном режиме селективность

разделения неионогенных компонентов будет лимитироваться обращено-фазовым механизмом удерживания, а удерживание оснований и кислот заметно возрастает, при этом улучшается форма хроматографических пиков.

Удерживание в ион-парном режиме обусловлено достаточно сложными равновесными процессами, конкурирующими между собой. С одной стороны, за счет гидрофобных взаимодействий и эффекта вытеснения полярной среды подвижной фазы возможна сорбция гидрофобный ионов на поверхности алкилсиликагеля таким образом, что заряженные группы обращены к подвижной фазе. В этом случае поверхность приобретает ионообменные свойства, и удерживание подчиняется закономерностям ионообменной хроматографии. С другой стороны, возможно образование ионной пары непосредственно в объеме элюента, с последующей ее сорбцией на сорбенте по обращено-фазовому механизму.

Хроматография гидрофильного взаимодействия (HILIC хроматография)

Хроматография гидрофильного взаимодействия используется для разделения полярных соединений, слабо удерживаемых в обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии. В качестве подвижной фазы в этом варианте хроматографии используются водно-ацетонитрильные смеси с добавлением солей, кислот или оснований. Неподвижными фазами, как правило, являются силикагели, модифицированные полярными группами (амино-, диольные, цианопропильные группы и т.д.). Более полярные соединения удерживаются сильнее. Элюирующая способность подвижной фазы возрастает с увеличением полярности.

Ионообменная и ионная высокоэффективная жидкостная хроматография

Ионообменная хроматография используется для анализа как органических (гетероциклические основания, аминокислоты, белки и др.), так и неорганических (различные катионы и анионы) соединений. Разделение

компонентов анализируемой смеси в ионообменной хроматографии основано на обратимом взаимодействии ионов анализируемых веществ с ионообменными группами сорбента. Эти сорбенты представляют собой, в основном, либо полимерные ионообменные смолы (обычно сополимеры стирола и дивинилбензола с привитыми ионообменными группами), либо силикагели с привитыми ионообменными группами. Сорбенты с группами: —NH_3^+, —NR_3^+, —NHR_2^+, —NH_2R^+ и др. используются для разделения анионов (аниониты), а сорбенты с группами: —SO_3^-, —RSO_3^-, –COO^- и др. для разделения катионов (катиониты).

В качестве подвижной фазы в ионообменной хроматографии применяют водные растворы кислот, оснований и солей. Обычно используют буферные растворы, позволяющие поддерживать определенные значения pH. Возможно также использование небольших добавок смешивающихся с водой органических растворителей – ацетонитрила, метанола, этанола, тетрагидрофурана.

Ионная хроматография – вариант ионообменной хроматографии, в котором для детектирования определяемых соединений (ионов) используется кондуктометрический детектор. Для высокочувствительного определения изменений электропроводности проходящей через детектор подвижной фазы фоновая электропроводность подвижной фазы должна быть низкой.

Существуют два основных варианта ионной хроматографии.

Первый из них – двухколоночная ионная хроматография, основан на подавлении электропроводности электролита подвижной фазы с помощью второй ионообменной колонки или специальной мембранной системы подавления, находящейся между аналитической колонкой и детектором. При прохождении через систему электропроводность подвижной фазы снижается.

Второй вариант ионной хроматографии – одноколоночная ионная хроматография. В этом варианте используется подвижная фаза с очень низкой электропроводностью. В качестве электролитов широко применяют слабые органические кислоты: бензойную, салициловую или изофталевую.

Эксклюзионная высокоэффективная жидкостная хроматография

Эксклюзионная хроматография (гель-хроматография) – особый вариант высокоэффективной жидкостной хроматографии, основанный на разделении молекул по их размерам. Распределение молекул между неподвижной и подвижной фазами основано на размерах молекул и частично на их форме и полярности.

Возможны два предельных типа взаимодействия молекул с пористой неподвижной фазой. Молекулы с размерами, превышающими максимальный диаметр пор, вообще не удерживаются и элюируются первыми, перемещаясь одновременно с подвижной фазой. Молекулы с размерами, меньшими чем минимальный диаметр пор сорбента, свободно проникают в поры и элюируются из колонки последними. Остальные молекулы, имеющие промежуточные размеры, удерживаются в порах частично и в ходе элюирования разделяются на фракции в соответствии со своими размерами и, частично, формой проникают в поры сорбента в зависимости от размера и частично в зависимости от своей формы. В результате вещества элюируются с различными временами удерживания.

Ионоэксклюзионная хроматография

В основе механима ионоэксклюзионной хроматографии лежит эффект, в результате которого соединения в ионизированной форме не удерживаются на сорбенте-ионообменнике, тогда как соединения в молекулярной форме распределяются между неподвижной и водной фазами внутри пор ионообменного сорбента и подвижной фазой мигрирующее в пространстве между частицами сорбента. Разделение основано на электростатическом отталкивании, полярных и гидрофобных взаимодействиях между растворенными соединениями и сорбентом.

Анионогенные группы на поверхности сорбента действуют как полупроницаемая «мембрана» между стационарной и подвижной фазами. Отрицательно заряженные компоненты не достигают стационарной подвижной фазы, так как отталкиваются одноименно заряженными

функциональными группами и элюируются в «мертвом» (свободном) объеме колонки. Компоненты в молекулярном виде не «отторгаются» катионообменным сорбентом и распределяются между стационарной и подвижной фазами. Различие в степени удерживания неионных компонентов смеси продиктовано совокупностью полярных взаимодействий неионных компонентов с функциональными группами катионообменного сорбента и гидрофобных взаимодействий неионных компонентов с неполярной матрицей сорбента.

Хиральная хроматография

Целью хиральной хроматографии является разделение оптических изомеров. Разделение осуществляется на хиральных неподвижных фазах или на обычных ахиральных неподвижных фазах с использованием хиральных подвижных фаз. В качестве хиральных неподвижных фаз используются сорбенты с поверхностью модифицированной, группами или веществами, имеющими хиральные центры (хитозаны, циклодекстрины, полисахариды, белки и др. (хиральные селекторы). В качестве подвижных фаз в этом случае могут использоваться те же фазы, что и в нормально-фазовой или обращенно-фазовой хроматографии. При использовании ахиральных неподвижных фаз для обеспечения разделения энантиомеров в подвижные фазы добавлятся хиральные модификаторы: хиральные комплексы металлов, нейтральные хиральные лиганды, хиральные ион-парные реагенты и др.

Ультраэффективная жидкостная хроматография

Ультраэффективная жидкостная хроматография представляет собой вариант жидкостной хроматографии, отличающийся большей эффективностью по сравнению с классической высокоэффективной жидкостной хроматографией.

Особенностью ультраэффективной жидкостной хроматографии является использование сорбентов с размером частиц от 1,5 до 2 мкм. Размеры хроматографических колонок обычно составляют от 50 до 150 мм в длину и от 1 до 4 мм в диаметре. Объем вводимой пробы может составлять

от 1 до 50 мкл. Использование таких хроматографических колонок позволяет значительно уменьшить время анализа и повысить эффективность хроматографического разделения. Однако, при этом давление на колонке может достигать 80–120 МПа, требуемая частота сбора данных детектора может возрастать до 40–100 герц, внеколоночный объем хроматографической системы должен быть минимизирован. Хроматографическое оборудование и колонки, используемые в ультраэффективной жидкостной хроматографии специально адаптированы для выполнения требований этого вида хроматографии.

Оборудование, предназначенное для ультраэффективной жидкостной хроматографии, может использоваться и в классическом варианте высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Критерии пригодности высокоэффективной жидкостной хроматографической системы и диапазоны допустимых изменений хроматографических параметров описаны в ОФС «Хроматография».

Сверхкритическая флюидная хроматография	**ОФС.1.2.1.2.0006.15** **Вводится впервые**

Сверхкритическим флюидом (или просто флюидом) называется вещество, находящееся при значениях температуры и давления выше критических (T_C и P_C соответственно). В этом состоянии (сверхкритическом флюидном) свойства вещества являются промежуточными между свойствами газа и жидкости. Хроматографический процесс, в котором в качестве подвижной фазы используется флюид, называется сверхкритической флюидной хроматографией.

С точки зрения применения флюида в качестве подвижной фазы в хроматографии важны его плотность, коэффициенты диффузии и вязкость:

- коэффициенты диффузии в сверхкритических фазах примерно на порядок больше коэффициентов диффузии в жидкостях, но примерно на порядок меньше, чем в газах;
- вязкость сверхкритических флюидов примерно на порядок меньше, чем жидкостей, но примерно на порядок больше, чем газов;
- растворяющая способность веществ в состоянии сверхкритического флюида больше, чем у газов;
- плотность основных флюидов, используемых в хроматографии, примерно на 2 – 3 порядка больше плотности газов и в несколько раз меньше плотности соответствующих жидкостей.

Применительно к сверхкритической флюидной хроматографии это означает что:

– достигаются меньшие времена анализа по сравнению с высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ);

– оптимальное значение линейной скорости потока выше, чем в ВЭЖХ;

– падение давления на колонке значительно меньше, чем в ВЭЖХ, что дает возможность использования колонок большей длины;

– хроматографическая эффективность в сверхкритической флюидной хроматографии выше, чем в ВЭЖХ (хотя и ниже, чем в газовой хроматографии).

– проведение разделения при более низких температурах, чем это принято в газовой хроматографии без существенной потери эффективности;

– проведение разделения соединений с большей молекулярной массой, чем это допускается в газовой хроматографии.

Оборудование

Хроматографическая система для сверхкритической флюидной хроматографии состоит из охлаждаемой насосной системы, инжектора, хроматографической колонки, помещенной в термостат, детектора, автоматического регулятора давления и системы сбора и обработки данных.

Насосная система необходима для поддержания постоянной скорости потока подвижной фазы. Колебания давления должны быть сведены к минимуму.

Инжекторы. Ввод пробы осуществляется непосредственно в колонку с помощью специального крана-дозатора.

Хроматографические колонки и неподвижные фазы, используемые в сверхкритической флюидной хроматографии, аналогичны применяемым в ВЭЖХ (набивные колонки) и в газовой хроматографии (капиллярные колонки). Максимальный внутренний диаметр капиллярной колонки 100 мкм. Хроматографическая колонка должна быть термостатирована и в ней должно поддерживаться определенное давление. Для этого используются специальные устройства – автоматические регуляторы давления.

Подвижные фазы

В качестве подвижной фазы в сверхкритической флюидной хроматографии могут использоваться различные флюиды, однако чаще всего используется углерода диоксид с различными полярными модификаторами. Это обусловлено его прозрачностью в ультрафиолетовой и видимой областях спектра, нетоксичностью, отсутствием запаха и дешевизной. Могут использоваться добавки модификаторов для улучшения растворимости в углерода диоксиде высокомолекулярных, ионных или полярных анализируемых веществ. Обычно в качестве добавок применяют органические растворители, смешивающиеся с углерода диоксидом (спирты, циклические эфиры).

В качестве других подвижных фаз применяют азота(I) оксид, аммиак, метанол, *н*-бутан, диэтиловый эфир, дифтордихлорметан.

Детекторы

Наиболее часто в сочетании со сверхкритической флюидной хроматографией используются спектрофотометрический, масс-спектрометрический детекторы и детектор светового рассеяния. Кроме того, возможно применение и других детекторов, используемых в ВЭЖХ и газовой хроматографии, таких как пламенно-ионизационный, пламенно-фотометрический, электронозахватный, флуориметрический, ИК-детектор, катарометр и др. Флюидная форма анализируемой пробы обуславливает благоприятные условия для применения масс-спектрометрического детектора.

Критерии пригодности сверхкритической флюидной хроматографической системы и диапазоны допустимых изменений хроматографических параметров описаны в ОФС «Хроматография».

Эксклюзионная хроматография	**ОФС.1.2.1.2.0007.18** **Вводится впервые**

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на метод эксклюзионной хроматографии, являющийся разновидностью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) по механизму разделения, предназначенный для определения молекулярных параметров различных веществ в широком диапазоне молекулярных масс - от 10^2 до 10^8 Да. Принцип метода эксклюзионной хроматографии изложен в ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография».

В отличие от адсорбционной хроматографии, в эксклюзионной хроматографии стационарная фаза остается химически инертной и с разделяемыми веществами не взаимодействует. В зависимости от природы подвижной фазы эксклюзионная хроматография подразделяется на две разновидности. При использовании органической подвижной фазы метод называют гель - проникающей хроматографией, при использовании водной подвижной фазы – гель – фильтрационной хроматографией.

Методом эксклюзионной хроматографии представляется возможным разделение молекул различных веществ по их размерам в широком диапазоне молекулярных масс, что делает его незаменимым для исследования лекарственных средств, представляющих собой синтетические или биологические полимеры.

Диапазон размеров разделяемых молекул определяется диапазоном размеров пор стационарной фазы. Высокомолекулярные вещества, размер которых превышает максимальный размер пор материала колонки, мигрируют с большей скоростью между частицами неподвижной фазы, не задерживаясь и элюируются в свободном объеме колонки (V_0 – объем колонки за вычетом объема стационарной фазы, соответствует объему удерживания компонентов, размер молекул которых больше, чем наибольшие поры сорбента). Молекулы с наименьшей молекулярной массой свободно проходят в поры сорбента вместе с молекулами растворителя, задерживаясь в них, и элюируются последними. Их объем удерживания близок к общему объему колонки ($V_{t,}$ или общий объём подвижной фазы, соответствующий объему удерживания компонентов, размер молекул которых меньше, чем наименьшие поры сорбента). Распределение молекул по размерам и молекулярной массе происходит в диапазоне между свободным объемом (V_0) и общим объемом колонки ($V_{t,}$), представляющим собой диапазон эксклюзии колонки. Наиболее эффективное распределение происходит в первые две трети данного диапазона.

ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Метод эксклюзионной хроматографии используется в качественном и количественном анализе лекарственных средств в различных испытаниях, указанных в ОФС «Высокоэффективной жидкостной хроматографии».

Определение относительного компонентного состава смесей.

Эксклюзионная хроматография применяется для разделения смесей, компоненты которых достаточно различаются по молекулярной массе, например, в лекарственных средствах белковой природы.

Разделение проводят по методике, указанной в фармакопейной статье и нормативной документации. Регистрируют хроматограмму и измеряют площади соответствующих пиков. Относительное содержание каждого компонента рассчитывают как отношение площади пика искомого компонента к сумме площадей пиков всех компонентов смеси. Если для

разных компонентов исследуемого образца чувствительность по регистрируемому параметру различается, то для расчета содержания компонентов применяют метод внешнего стандарта с использованием соответствующих стандартных веществ, указанных в фармакопейной статье и нормативной документации.

Определение молекулярных масс соединений и молекулярно-массового распределения полимеров.

Эксклюзионная хроматография может быть использована для определения молекулярной массы вещества и ее распределения путем сравнения с соответствующими стандартными веществами для калибровки, указанными в фармакопейной статье и нормативной документации. По стандартным образцам с известными значениями молекулярной массы строят калибровочную кривую зависимости объема или времени удерживания от логарифма молекулярных масс. По калибровочной кривой рассчитывают молекулярную массу испытуемого образца. Если диапазон молекулярных масс стандартных образцов укладывается в диапазон эксклюзии колонки, калибровочная кривая приближается к прямой линии для данной колонки.

Следует учитывать, что времена удерживания или объемы элюирования анализируемых полимеров не характеризуются прямой связью с молекулярной массой исследуемого вещества и зависят от условий измерений (типа полимера, колонок, подвижной фазы и т.д.) Фактически разделение обеспечивается за счет разного гидродинамического объема молекул образца, т.е. разного размера молекул, имеющего определенную связь с массой. Поэтому для корректного определения молекулярной массы и оценки молекулярно-массового распределения необходима точная калибровка хроматографической системы, выполненная в условиях анализа исследуемого образца. При этом природа стандартных образцов по возможности должна быть аналогичной природе испытуемого вещества.

ОБОРУДОВАНИЕ

Оборудование для эксклюзионной хроматографии принципиально не отличается от используемого в других видах высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография»). Основное отличие заключается в применении хроматографических колонок, заполненных специальными сорбентами.

Из всех видов жидкостной хроматографии в эксклюзионной хроматографии наиболее жесткие требования предъявляются к стабильности потока подвижной фазы. Поэтому при эксклюзионной хроматографии необходимо использовать насосные системы с точностью подачи подвижной фазы не хуже 0,3-0,5 %. Разделение в эксклюзионной хроматографии всегда изократическое.

Точность результатов в эксклюзионной хроматографии значительно зависит от температуры, поэтому, как правило, требуется термостатирование разделительной системы.

Неподвижная фаза (сорбенты)

Современные сорбенты для эксклюзионной хроматографии представляют собой полужесткие или жесткие гели или пористые частицы на основе поперечно-сшитой агарозы, декстрана, полимеров, таких как полиметакрилат или стирол-дивинилбензол, гидроксилированного силикагеля. Главной характеристикой таких сорбентов являются размеры пор, определяющие диапазон молекулярных масс, которые можно разделить на данном сорбенте. Если анализируемая смесь содержит вещества, отличающиеся по молекулярной массе не более чем на 2-2,5 порядка, ее обычно удается разделить на хроматографической колонке с одним набором пор. При более широком диапазоне молекулярных масс следует использовать единовременно несколько колонок с сорбентами различной пористости.

Детекторы

В эксклюзионной хроматографии используются следующие детекторы: рефрактометрический, спектрофотометрический, флуориметрический. Специально для анализа полимеров разработаны вискозиметрический детектор и детектор многоуглового лазерного светорассеяния. Эти детекторы в комбинации с рефрактометром или другим концентрационным детектором позволяют непрерывно определять молекулярную массу полимера в элюате.

Подвижная фаза

Подвижную фазу выбирают исходя из свойств испытуемого образца, типа сорбента колонки и метода.

Подвижные фазы для анализа водорастворимых соединений обычно представляют собой растворы неорганических солей таких как хлорид, нитрат или сульфат натрия иногда с добавкой антимикробного агента (например, азида натрия). Наличие соли в подвижной фазе необходимо для предотвращения нежелательных сорбционных эффектов.

Оценка пригодности хроматографической системы

Критерии оценки пригодности хроматографической системы, а также при необходимости допустимая степень изменения ее параметров указаны в ОФС «Хроматография». При определении молекулярной массы и молекулярно-массового распределения полимеров требуются дополнительные критерии, связанные с оценкой пригодности калибровочной кривой, которые должны быть указаны в фармакопейной статье и нормативной документации.

Ионообменная	**ОФС.1.2.1.2.0008.18**
хроматография	**Взамен ГФ XI, вып.1**

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на метод ионообменной хроматографии.

Ионообменная хроматография является разновидностью метода жидкостной колоночной хроматографии по механизму разделения, в котором подвижной фазой служит жидкость, движущаяся через хроматографическую колонку, заполненную неподвижной фазой (сорбентом).

Область применения

Данный метод предназначен для разделения и определения ионов при помощи ионообменников в результате их работы в динамическом режиме ионного обмена. Особенно широко она используется для определения неорганических ионов. Кроме того, ионообменная хроматография может использоваться для разделения сахаров, органических кислот, аминокислотного анализа с постколоночной дериватизацией и др.

Основы метода

В основе ионообменной хроматографии лежит обратимая сорбция ионов анализируемого раствора ионогенными группами сорбента. Обратимый обмен ионами в системе сорбент – растворитель протекает в этом случае с соблюдением стехиометрических отношений.

В зависимости от характера ионогенных групп ионообменные сорбенты (иониты) разделяются на катионообменные (катиониты) и анионообменные (аниониты).

Классический метод ионообменной хроматографии подразумевает разделение ионов в условиях низкого давления подачи элюента в колонку.

Ионной хроматографией называют высокоэффективный вариант ионообменной хроматографии, в котором для детектирования определяемых соединений (ионов) используется кондуктометрический детектор. Для высокочувствительного определения изменений электропроводности проходящей через детектор подвижной фазы фоновая электропроводность подвижной фазы должна быть низкой.

Существуют два основных варианта ионной хроматографии.

Первый из них основан на подавлении электропроводности электролита подвижной фазы с помощью второй ионообменной колонки или специальной мембранной системы подавления, находящейся между аналитической колонкой и детектором. При прохождении подвижной фазы через подавляющее устройство электропроводность снижается за счет преобразования входящих в состав подвижной фазы компонентов в менее электропроводящие (менее диссоциированные) соединения.

Во втором варианте ионной хроматографии используется подвижная фаза с очень низкой электропроводностью. В качестве электролитов широко применяют слабые органические кислоты: бензойную, салициловую или изофталевую.

Еще одной разновидностью ионообменной хроматографии является **ионэксклюзионная хроматография**. В основе механима ионоэксклюзионной хроматографии лежит эффект, в результате которого соединения в ионизированной форме не удерживаются на сорбенте-ионообменнике, тогда как соединения в молекулярной форме распределяются между неподвижной и водной фазами внутри пор ионообменного сорбента и подвижной фазой мигрирующее в пространстве

между частицами сорбента. Разделение основано на электростатическом отталкивании, полярных и гидрофобных взаимодействиях между растворенными соединениями и сорбентом.

Анионогенные группы на поверхности сорбента действуют как полупроницаемая «мембрана» между стационарной и подвижной фазами. Отрицательно заряженные компоненты не достигают стационарной подвижной фазы, так как отталкиваются одноименно заряженными функциональными группами и элюируются в «мертвом» (свободном) объеме колонки. Компоненты в молекулярном виде не «отторгаются» катионообменным сорбентом и распределяются между стационарной и подвижной фазами. Различие в степени удерживания неионных компонентов смеси продиктовано совокупностью полярных взаимодействий неионных компонентов с функциональными группами катионообменного сорбента и гидрофобных взаимодействий неионных компонентов с неполярной матрицей сорбента.

Оборудование

Для классической ионообменной хроматографии чаще всего используются системы собранные из различных узлов, тогда как для ионной хроматографии обычно пользуются уже готовым прибором – хроматографом. Однако основные компоненты хроматографической системы для обеих разновидностей ионообменной хроматографии совпадают с набором узлов для любой колоночной жидкостной хроматографии (насосная система, хроматографическая колонка, система детектирования, система сбора и обработки данных и др.)

Неподвижная фаза

Неподвижная фаза представляет собой сорбент состоящий, в основном, либо из полимерных ионообменных смол (обычно сополимеры стирола и дивинилбензола с привитыми ионообменными группами), либо являющихся силикагелем с привитыми ионообменными группами. Для ионной хроматографии возможно использование сорбентов на основе сферических

частиц непористого стекла или высокопрочного полимера, покрытых тонким слоем пористого ионообменника.

Макромолекулы катионитов содержат кислотные группы различной силы, например, такие как сульфогруппы, карбоксильные и оксифенильные и другие группы (—SO_3^-, —RSO_3^-, –COOH, —PO_3^- и др.)

Макромолекулы анионитов, наоборот, имеют в своем составе основные группы, например, алифатические или ароматические аминогруппы различной степени замещенности (вплоть до четвертичных, —NH_3^+, —R_3N^+, —R_2HN^+, —RH_2N^+ и др.)

В Н-форме катиониты и в ОН-форме аниониты соответственно содержат в способном к обмену состоянии только ионы водорода или гидроксила. В солевых формах ионы водорода заменены катионами металлов или органических оснований, а анионы гидроксила – анионами кислот.

Применение ионитов для цели хроматографического анализа возможно как в солевых, так и в Н- и ОН-формах.

Подвижная фаза

В качестве подвижной фазы в ионообменной хроматографии применяют водные растворы кислот, оснований и солей. Обычно используют буферные растворы, позволяющие поддерживать определенные значения pH. Возможно также использование небольших добавок смешивающихся с водой органических растворителей – ацетонитрила, метанола, этанола, тетрагидрофурана.

В ионной хроматографии для повышения качества анализа возможно использование специфического оборудования. Например, для подачи чистого элюента в колонку возможно применение различных генераторов элюента (диффузионный генератор, электрогенератор с мембраной). Для создания градиента возможно использование различных смесителей. В высокоэффективном варианте для нанесения на колонку исследуемого вещества зачастую используется инжектор.

Для подавления собственной электропроводности подвижной фазы в ионной хроматографии возможно использование подавляющих колонок или мембранных подавителей. С помощью колоночного подавления раствор подвижной фазы с собственными ионами и высокой электропроводностью превращается при ионном обмене в малодиссоциированный и обладающий очень малой электропроводностью раствор. Определяемые ионы при этом не претерпевают никаких химических превращений и сохраняют свою электропроводность. При определении анионов подавляющую колонку заполняют катионообменником высокой емкости в Н-форме. При определении катионов подавляющую колонку заполняют анионообменником высокой емкости в ОН-форме. Эта колонка устанавливается после разделяющей перед кондуктометрическим детектором. Недостаток использования подавляющих колонок состоит в том, что после определенного времени работы (обычно не более 10 ч) емкость ионообменника падает, и его приходится регенерировать с помощью NaOH или HCl в зависимости от природы ионообменника. Поэтому для уменьшения собственной электропроводности подвижной фазы также возможно использование мембранных подавителей, непрерывно регенерируемых в процессе работы.

Рис.1 Мембранный подавитель

Методика разделения

Для проведения ионообменной хроматографии хроматографическую колонку заполняют сорбентом. Хроматографические колонки обычно представляют собой трубки из материала, не вступающего в реакцию ни с сорбентом, ни с разделяемым веществом, ни с элюентом (например, из стекла или пластика). Процесс разделения можно проводить как при комнатной температуре, так и в термостатируемых колонках с указанием температуры и при уверенности в термостабильности неподвижной фазы. Предварительно ионообменник выдерживают в разбавленной хлористоводородной кислоте несколько часов, а затем промывают водой очищенной до отрицательной реакции на хлориды. В качестве неподвижной фазы (сорбента), как уже было указано ранее, чаще всего используют силикагель, смолы или полимеры с привитыми кислотными или основными группами. Сорбент в хроматографической колонке должен быть упакован равномерно и плотно. В ионной хроматографии обычно используются готовые колонки промышленного производства, поэтому их набивание сорбентом не требуется. Эффективность разделения также зависит от размера частиц и пор сорбента, которые формируют площадь поверхности соприкосновения неподвижной фазы с разделяемым веществом и элюентом, а также определяют количество привитых ионообменных групп. Для подачи подвижной фазы в колонку с заданной скоростью используются различные насосные системы. Скорость подачи может регулироваться. Возможно использование различных смесителей для создания градиента. Объем смесителя может влиять на время удерживания компонентов при градиентном элюировании. Также возможно использование различных инжекторов для ввода пробы в колонку.

Хроматографирование проводят, пропуская анализируемый раствор через колонку. Количество продуктов ионного обмена, содержащегося в смеси прошедшего через колонку анализируемого раствора и промывочной

жидкости, эквивалентно количеству адсорбированных на колонке катионов или анионов анализируемого раствора. Регенерацию колонки после проведения анализа проводят с помощью растворов разбавленной хлористоводородной кислоты в случае катионита и разбавленного раствора карбоната натрия в случае анионита. После этого колонку промывают водой до нейтральной реакции.

Для детектирования возможно использование различных методов. Самым распространенным является спектрофотометрический метод. Для этого используют специальные проточные кюветы, в которых измеряется оптическая плотность проходящего сквозь нее элюата при выбранной длине волны. Спектрофотометрический детектор используется, как правило, для диапазона длин волн 190-600 нм. Для детектирования ионов, не обладающих собственным светопоглощением, возможно применение косвенного фотометрического детектирования. В этом случае в качестве элюента используется раствор вещества, поглощающего в УФ-области, например фталиевой кислоты. При выходе из колонки пиков разделяемых ионов интенсивность фонового поглощения уменьшается. Для прямого фотометрического детектирования не обладающих собственным светопоглощением ионов, можно использовать их химическое превращение в другие вещества, напротив, светопоглощающие. Для этих целей возможно использование мембранного устройства, через которое пропускают раствор реагента, образующего с определяемыми ионами поглощающие комплексы.

В случае ионной хроматографии в качестве метода детектирования используются кондуктометрическое детектирование. Для водных растворов электролитов электропроводность прямо пропорциональна их концентрации. Однако ввиду того, что в ионной хроматографии элюент сам представляет собой раствор электролита достаточно высокой концентрации и поэтому обладает собственной электропроводностью, детектирование путем простого измерения электропроводности зачастую затруднено. Поэтому, в ионной хроматографии для решения проблем детектирования при высокой

собственной электропроводности подвижной фазы, может использоваться дополнительная подавляющая колонка. Если собственная электропроводность подвижной фазы достаточно мала, то возможно использование и одноколоночной ионной хроматографии. В этом случае необходимо использование разделяющей колонки с ионообменником малой емкости. В качестве элюентов, обладающих малой электропроводностью, возможно использование растворов слабых органических кислот (бензойной, фталиевой, салициловой и др.) В этом случае, однако, следует очень точно поддерживать значение pH раствора.

Основные этапы методики разделения для классической ионообменной хроматографии и высокоэффективной ионной хроматографии одинаковы. Основная разница заключается в способе подачи элюента, давлении в системе и способе детектирования.

Перечень условий хроматографирования, подлежащих указанию

В фармакопейной статье должны быть приведены: параметры колонки (длина и внутренний диаметр), тип сорбента с указанием размера частиц, размера пор, температура колонки (если необходимо термостатирование), объем вводимой пробы (объем петли), состав подвижной фазы и способ ее приготовления, скорость подачи подвижной фазы, тип детектора и условия детектирования (при необходимости параметры используемой ячейки детектора), описание градиентного режима (если используется), включающее в себя стадию переуравновешивания к исходным условиям, время хроматографирования, описания приготовления стандартных и испытуемых растворов.

Афинная хроматография	**ОФС.1.2.1.2.0009.18** **Вводится впервые**

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на метод аффинной хроматографии.

Афинная хроматография является разновидностью метода хроматографии по механизму разделения, основанному на высокоспецифичном взаимодействии между веществом.

Область применения

Данный метод в основном предназначен для разделения и определения и очистки белков, пептидов, антител, полисахаридов и др. в зависимости от лиганда, используемого в анализе.

Основы метода

В основе аффинной хроматографии лежит взаимодействие определяемого вещества из смеси с лигандом, связанным с инертным носителем, образующими неподвижную фазу. Главной особенностью аффинной хроматографии является высокая специфичность лиганда, иммобилизованного на носителе, к определяемому веществу, или так называемая афинность. Специфичность реакции обычно обусловлена взаимодействием фермент-субстрат, антиген-антитело или гормон-рецептор. Однако, возможно использование аффинной хроматографии и для других

типов высокоспецифического взаимодействия, например, фермент-кофактор, фермент-ингибитор, пептиды-специфические антитела и др.

Существует несколько разновидностей метода аффинной хроматографии таких, например, как колоночная аффинная хроматография, мембранная аффинная хроматография и др.

Колночная афинная хроматография обычно идет в 2 этапа: 1) сорбция определяемого вещества или группы веществ на колонки путем их реакции с иммобилизованным на носителе лигандом; 2) промежуточная промывка колонки для удаления не специфически связанных компонентов; 3) десорбция исследуемого компонента смеси с колонки. Для первого этапа подбирают такие условия (состав буферного раствора, pH, ионная сила буферного раствора, температура и т.д.), которые являются наиболее благоприятными для взаимодействия аффинной пары. После этого колонку хорошо промывают и проводят десорбцию определяемого вещества. Это обычно достигается с помощью повышения ионной силы буферного раствора, повышением или понижением его pH или добавлением различных органических растворителей или введением в буферный раствор различных хаотропных агентов. Также можно проводить десорбцию раствором конкурирующего лиганда. Иногда для лучшей десорбции и получения более качественной хроматограммы используют линейный градиент (pH, ионной силы или содержания органического растворителя).

В мембранной аффинной хроматографии вместо колонки с сорбентом используется фильтрационный элемент, с иммобилизованном на нем специфическом лиганде. Мембранная аффинная хроматография в целом состоит из тех же этапов, однако специфика мембранного метода позволяет уменьшить объем сорбента, благодаря эффективности сорбента в виде мембраны. Кроме того, в мембранном варианте резко возрастает скорость очистки при близкой к колоночной эффективности. Благодаря меньшим

объемам использования буферного раствора и непосредственно самого сорбента, процесс легче масштабировать.

Тонкослойная аффинная хроматографя представляет собой классический вариант тонкослойной хроматографии, где на пластинку иммобилизован специфический лиганд.

Однако чаще всего в фармакопейном анализе используется колоночный вариант аффинной хроматографии.

Оборудование

Для колоночной аффинной хроматографии используется стандартное оборудование для колоночной хроматографии. Набор необходимых узлов системы обычно включает в себя хроматографическую колонку, насос, систему ввода пробы, систему детектирования, систему сбора и обработки данных. Возможно использование коллектора фракций и градиентного смесителя.

Неподвижная фаза

Неподвижная фаза аффинной хроматографии представляет собой специально синтезированный сорбент, состоящий из инертного носителя, соединенного со специфическим лигандом (возможно использование «спейсера» для сшивки). В качестве инертного носителя часто используют сефарозу (агарозу, имеющую дополнительные поперечные сшивки), например сефароза 4B или сефароза CL, однако при необходимости возможно использование и других носителей, в том числе неорганических. Содержание лиганда обычно не превышает 5-15 мкмоль на 1г носителя. Однако его должно быть достаточно, чтобы хроматография имела приемлемый выход. Лиганд и его связь с матрицей должны быть достаточно стабильны в установленных хроматографических условиях (температура, pH, ионная сила и т.д.). В качестве лиганда может выступать практически любое соединение, имеющие специфичность к определяемому веществу. Это может

быть субстрат или ингибитор фермента, рецептор, специфичный к определяемому гормону, антитела или др. Кроме того, лиганды могут быть также группоспецифические, то есть обладающие специфичностью сразу к целой группе родственных веществ, например, к какой-либо группе ферментов.

Подвижная фаза

Подвижная фаза аффинной хроматографии представляет собой жидкий элюент, инертный по отношению к другим компонентам хроматографии (неподвижная фаза, опредляемое вещество). Подвижная фаза должна обладать низкой вязкостью и быть совместимой с используемыми методами детектирования. В качестве подвижной фазы обычно буферные водные растворы с различными pH, состав элюента подбирается в зависимости от условий хроматографирования. Чаще всего, из-за сильного удерживания компонетов смеси сорбентом, необходимо использование ступенчатого или линейного градиентного элюирования.

Методика

Методика проведения колоночной аффинной хроматографии аналогична методике любой стандартной колоночной хроматографии. Прежде всего, подготавливается хроматографическая колонка. Для этого осуществляется правильная «набивка» колонки сорбентом. Для плотного и равномерного заполнения колонки возможно использование суспензионного метода. После этого колонка обязательного уравновешивается. Затем в колонку под давлением подается элюент. Проба может вводиться как фронтальным методом, так и через специальный дозирующий кран с известным объемом петли. На выходе из колонки раствор элюента с разделенными определяемыми компонентами проходит через детектор. В качестве детектора возможно использование любой детектирующей системы для колоночной жидкостной хроматографии (см. ОФС «Хроматография»,

ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография»). Возможно проведение постколоночной дериватизации для увеличения чувствительности детектирования. Для регистрации результатов хроматографии и получения хроматограммы возможно использование самописца, однако предпочтительнее использование компьтюерного сбора и обработки данных. Это повышает точность анализа и позволяет сразу провести анализ хроматограммы с помощью специальных программ, подсчитывающих в автоматическом режиме параметры хроматограммы (например, площадь пиков). Для сбора проб возможно использование коллектора фракций, подключенного к системе сбора данных.

Перечень условий хроматографирования, подлежащих указанию

В фармакопейной статье должны быть приведены: параметры колонки (длина и внутренний диаметр) и температура колонки (если необходимо термостатирование) для колоночной аффинной хроматографии, параметры мембраны (площадь, количество слоев) для мембранной аффинной хроматографии или параметры пластинки для афинной ТСХ (в соответствии с ОФС «Тонкослойная хроматография»); тип сорбента с указанием иммобилизованного лиганда; объем вводимой пробы (объем петли); состав подвижной фазы и способ ее приготовления; скорость подачи подвижной фазы; тип детектора и условия детектирования (при необходимости параметры используемой ячейки детектора); описание градиентного режима (если используется), включающее в себя стадию переуравновешивания к исходным условиям, время хроматографирования, описания приготовления стандартных и испытуемых растворов.

Испытание на чистоту и допустимые пределы примесей

Определение примесей в лекарственных средствах и оценку их содержания проводят с помощью:

– визуального сравнения с эталонными растворами, устанавливающими предел содержания данной примеси, после проведения реакции с испытуемым и эталонным растворами. Окраска или опалесценция/помутнение испытуемого раствора должна быть не интенсивнее окраски или опалесценции/помутнения эталонного раствора;

– физико-химических методов (спектроскопические, хроматографические и другие методы).

Общие замечания

1. Вода и все реактивы должны быть свободны от ионов, на содержание которых проводят испытания.

2. Пробирки, в которых проводят наблюдения, должны быть бесцветными, прозрачными, из нейтрального стекла с плоским дном, одинакового диаметра (около 1,5 см, если не указано иначе).

3. Если не указано иначе, навески для приготовления эталонных растворов отвешивают с точностью до 0,001 г.

4. Наблюдения помутнения и опалесценции растворов проводят в проходящем свете на темном фоне, а окраски – по оси пробирок при дневном отраженном свете на матово-белом фоне.

5. Прибавление реактивов к испытуемому и эталонному растворам проводят одновременно и в одинаковых количествах.

6. В случае, когда в соответствующей фармакопейной статье или нормативной документации указано, что в данной концентрации раствора не должно обнаруживаться той или иной примеси, поступают следующим образом. К 10 мл испытуемого раствора прибавляют применяемые для

каждой реакции реактивы, указанные в методике, кроме основного реактива, открывающего данную примесь. Затем раствор делят на две равные части: к одной из них прибавляют основной реактив и оба раствора сравнивают между собой. Между ними не должно быть заметной разницы.

Алюминий. Около 15 мг лекарственного средства растворяют в 2 мл воды. К полученному раствору или к 2 мл раствора, приготовленного как указано в фармакопейной статье, прибавляют 0,5 мл хлористоводородной кислоты разведенной 8,3 % и 0,5 мл тиоацетамида реактива; осадок не образуется. Затем по каплям прибавляют натрия гидроксида раствор 8,5 %; образуется гелеобразный белый осадок, растворимый при последующем прибавлении натрия гидроксида раствора 8,5 %. Постепенно прибавляют аммония хлорида раствор 10 %; снова образуется гелеобразный белый осадок.

Амины ароматические первичные. Около 50 мг лекарственного средства растворяют в 1 мл хлористоводородной кислоты разведенной 8,3 %, нагревают при необходимости, охлаждают во льду, прибавляют 2 мл натрия нитрита раствора 1 %. Полученный раствор прибавляют к 1 мл *β*-нафтола щелочного раствора 2 %, содержащему 0,5 г натрия ацетата; появляется от жёлто-оранжевого до оранжево-красного окрашивание, и обычно образуется осадок такого же цвета.

Аммоний. 1 мл раствора соли аммония (2–6 мг аммоний-иона) нагревают с 0,5 мл натрия гидроксида раствора 10 %; выделяется аммиак, обнаруживаемый по запаху и по посинению влажной красной лакмусовой бумаги.

Ацетаты

А. 2 мл раствора ацетата (20–60 мг ацетат-иона) нагревают с равным количеством серной кислоты концентрированной и 0,5 мл спирта 96 %; появляется характерный запах этилацетата.

Б. К 2 мл нейтрального раствора ацетата (20–60 мг ацетат-иона) прибавляют 0,2 мл 3 % раствора железа(III) хлорида; появляется красно-бурое окрашивание, исчезающее при прибавлении разведённых неорганических кислот.

Бензоаты. К 2 мл нейтрального раствора бензоата (10–20 мг бензоат-иона) прибавляют 0,2 мл железа(III) хлорида раствора 3 %; образуется розовато-желтый осадок, растворимый в эфире.

Бромиды

А. К 1 мл раствора бромида (2–30 мг бромид-иона) прибавляют 1 мл хлористоводородной кислоты разведенной 8,3 %, 0,5 мл хлорамина раствора 5 %, 1 мл хлороформа и взбалтывают; хлороформный слой окрашивается в желто-бурый цвет.

Б. К 2 мл раствора бромида (2–10 мг бромид-иона) прибавляют 0,5 мл азотной кислоты разведенной 16 % и 0,5 мл серебра нитрата раствора 2 %; образуется желтоватый творожистый осадок, нерастворимый в азотной кислоте разведенной 16 % и трудно растворимый в аммиака растворе 10 %.

Висмут

А. Указанное в фармакопейной статье количество лекарственного средства (около 50 мг висмут-иона) взбалтывают с 3 мл хлористоводородной кислоты разведенной 8,3 % и фильтруют. К фильтрату прибавляют 1 мл натрия сульфида раствора 2 %; образуется коричневато-черный осадок, растворимый при прибавлении равного объема азотной кислоты концентрированной.

Б. Указанное в фармакопейной статье количество лекарственного средства (около 50 мг висмут-иона) взбалтывают с 5 мл серной кислоты разведенной 16 % и фильтруют. К фильтрату прибавляют две капли калия

йодида раствора 10 %; образуется черный осадок, растворимый в избытке реактива с образованием раствора желтовато-оранжевого цвета.

Железо(II). К 2 мл раствора соли железа(II) (около 20 мг железо(II)-иона) прибавляют 0,5 мл хлористоводородной кислоты разведенной 8,3 % и 1 мл калия феррицианида раствора 5 %; образуется синий осадок.

Железо(III)

А. К 2 мл раствора соли железа(III) (около 1 мг железо(III)-иона) прибавляют 0,5 мл хлористоводородной кислоты разведенной 8,3 % и 1–2 капли калия феррицианида раствора 5 %; образуется синий осадок.

Б. К 2 мл раствора соли железа(III) (около 1 мг железо(III)-иона) прибавляют 0,5 мл хлористоводородной кислоты разведенной 8,3 % и 1–2 капли аммония тиоцианата раствора 5 %; появляется красное окрашивание.

Йодиды

А. К 2 мл раствора йодида (3–20 мг йодид-иона) прибавляют 0,2 мл серной кислоты разведенной 16 %, 0,2 мл натрия нитрита раствора 10 % или железа(III) хлорида раствора 3 % и 2 мл хлороформа; при взбалтывании хлороформный слой окрашивается в фиолетовый цвет.

Б. К 2 мл раствора йодида (2–10 мг йодид-иона) прибавляют 0,5 мл азотной кислоты разведенной 16 % и 0,5 мл серебра нитрата раствора 2 %; образуется желтый творожистый осадок, нерастворимый в азотной кислоте разведенной 16 % и аммиака растворе 10 %.

В. При нагревании 0,1 г лекарственного средства с 1 мл серной кислоты концентрированной выделяются пары фиолетового цвета.

Калий

А. К 2 мл раствора соли калия (10–20 мг калий-иона) прибавляют 1 мл винной кислоты раствора 20 %, 1 мл натрия ацетата раствора 10 %, 0,5 мл спирта 96 % и встряхивают; постепенно образуется белый кристаллический осадок, растворимый в разведённых неорганических кислотах и растворах гидроксидов щелочных металлов.

Б. К 2 мл раствора соли калия (5–10 мг калий-иона), предварительно прокаленной для удаления солей аммония, прибавляют 0,5 мл уксусной кислоты разведенной 30 % и 0,5 мл натрия кобальтинитрита раствора 10 %; образуется желтый кристаллический осадок.

В. Соль калия, внесенная в бесцветное пламя, окрашивает его в фиолетовый цвет или при рассматривании через синее стекло – в пурпурно-красный.

Кальций

А. К 1 мл раствора соли кальция (2–20 мг кальций-иона) прибавляют 1 мл аммония оксалата раствора 4 %; образуется белый осадок, нерастворимый в уксусной кислоте разведенной 30 % и аммиака растворе 10 %, растворимый в разведённых неорганических кислотах.

Б. Соль кальция, смоченная хлористоводородной кислотой 25 % и внесенная в бесцветное пламя, окрашивает его в кирпично-красный цвет.

Карбонаты (гидрокарбонаты)

А. К 0,2 г карбоната (гидрокарбоната) или к 2 мл раствора карбоната (гидрокарбоната) (1:10) прибавляют 0,5 мл хлористоводородной кислоты разведенной 8,3 %; выделяется газ, при пропускании которого через раствор кальция гидроксида образуется белый осадок.

Б. К 2 мл раствора карбоната (1:10) прибавляют 5 капель магния сульфата насыщенного раствора; образуется белый осадок (гидрокарбонат образует осадок только при кипячении смеси).

В. Раствор карбоната (1:10) при прибавлении одной капли фенолфталеина раствора 1 % окрашивается в красный цвет (отличие от гидрокарбоната).

Лактаты. Навеску испытуемой субстанции, соответствующую около 5 мг молочной кислоты, растворяют в 5 мл воды или используют 5 мл раствора, приготовленного как описано в фармакопейной статье. Прибавляют 1 мл бромной воды, 0,5 мл серной кислоты разведённой 9,8 %. Нагревают на водяной бане до обесцвечивания, периодически перемешивая раствор

стеклянной палочкой. Прибавляют 4 г аммония сульфата и перемешивают. Прибавляют по каплям, без перемешивания, 0,2 мл натрия нитропруссида раствора 10 % в серной кислоте разведённой 9,8 %. Прибавляют без перемешивания 1 мл аммиака раствора концентрированного 25 %. Выдерживают 30 мин при комнатной температуре. В месте соединения двух жидкостей должно появиться тёмно-зелёное кольцо.

Магний. К 1 мл раствора соли магния (2–5 мг магний-иона) прибавляют 1 мл аммиака раствора 10 %; образуется белый осадок. Прибавляют 1 мл аммония хлорида раствора 10 %; осадок растворяется. Прибавляют 1 мл динатрия гидрофосфата додекагидрата раствора 5 %; образуется белый кристаллический осадок растворимый в разведённых неорганических кислотах и уксусной кислоте.

Мышьяк

1. Арсениты

А. К 0,3 мл раствора соли мышьяка(III) (около 30 мг арсенит-иона) прибавляют 0,5 мл хлористоводородной кислоты разведенной 8,3 % и две капли натрия сульфида раствора 2 %; образуется желтый осадок, нерастворимый в хлористоводородной кислоте концентрированной, растворимый в аммиака растворе 10 %.

Б. К 0,3 мл раствора соли мышьяка(III) (около 3 мг арсенит-иона) прибавляют 1 – 2 капли серебра нитрата раствора 2 %; образуется желтый осадок, растворимый в азотной кислоте разведенной 16 % и аммиака растворе 10 %.

2. Арсенаты

А. К 0,3 мл раствора соли мышьяка(V) (около 30 мг арсенат-иона) прибавляют 0,5 мл хлористоводородной кислоты разведенной 8,3 %, две капли натрия сульфида раствора 2 % и нагревают; образуется желтый осадок, нерастворимый в хлористоводородной кислоте концентрированной, растворимый в аммиака растворе 10 %.

Б. К 0,3 мл раствора соли мышьяка(V) (около 1 мг арсенат-иона) прибавляют 1–2 капли серебра нитрата раствора 2 %; образуется коричневый осадок, растворимый в азотной кислоте разведенной 16 % и аммиака растворе 10 %.

В. К 0,3 мл раствора соли мышьяка(V) (около 1 мг арсенат-иона) прибавляют 1 мл аммония хлорида раствора 10 %, 1 мл аммиака раствора 10 % и 1 мл магния сульфата раствора 10 %; образуется белый кристаллический осадок, растворимый в хлористоводородной кислоте разведенной 8,3 % (отличие от арсенитов).

Натрий

А. К 2 мл раствора натриевой соли (7–10 мг натрий-иона) прибавляют 2 мл калия карбоната раствора 15 % и нагревают до кипения; осадок не образуется. К раствору прибавляют 4 мл калия пироантимоната раствора и нагревают до кипения. Охлаждают в ледяной воде и при необходимости потирают внутренние стенки пробирки стеклянной палочкой; образуется плотный осадок белого цвета.

Б. Соль натрия, смоченная хлористоводородной кислотой 25 % и внесенная в бесцветное пламя, окрашивает его в желтый цвет.

Нитраты

А. К лекарственному средству (около 1 мг нитрат-иона) прибавляют две капли дифениламина раствора; появляется синее окрашивание.

Б. К лекарственному средству (2 – 5 мг нитрат-иона) прибавляют по 2–3 капли воды и серной кислоты концентрированной, 0,05–0,10 г металлической меди и нагревают; выделяются пары бурого цвета.

В. Нитраты (около 2 мг нитрат-иона) не обесцвечивают калия перманганата раствор 0,1 %, подкисленный серной кислотой разведенной 16 % (отличие от нитритов).

Нитриты

А. К лекарственному средству (около 1 мг нитрит-иона) прибавляют две капли дифениламина раствора; появляется синее окрашивание.

Б. К лекарственному средству (около 30 мг нитрит-иона) прибавляют 1 мл серной кислоты разведенной 16 %; выделяются желто-бурые пары (отличие от нитратов).

В. Несколько кристаллов феназона растворяют в фарфоровой чашке в двух каплях хлористоводородной кислоты разведенной 8,3 %, прибавляют две капли раствора нитрита (около 1 мг нитрит-иона); появляется зеленое окрашивание (отличие от нитратов).

Ртуть(II)

А. К 2 мл раствора соли ртути(II) (около 50 мг ртуть(II)-иона) прибавляют 0,5 мл натрия гидроксида раствора 10 %; образуется жёлтый осадок.

Б. К 1 мл раствора соли ртути(II) (10–30 мг ртуть(II)-иона) прибавляют осторожно по каплям калия йодида раствор 10 %; образуется красный осадок, растворимый в избытке реактива.

Салицилаты. К 2 мл нейтрального раствора салицилата (2–10 мг салицилат-иона) прибавляют 2 капли железа(III) хлорида раствора 3 %; появляется сине-фиолетовое или красно-фиолетовое окрашивание, которое сохраняется при прибавлении небольшого количества уксусной кислоты разведенной 30 %, но исчезает при прибавлении хлористоводородной кислоты разведенной 8,3 %. При этом образуется белый кристаллический осадок.

Серебро

А. К 1 мл раствора соли серебра (около 5 мг серебра-иона) прибавляют 0,2 мл хлористоводородной кислоты разведенной 8,3 %; образуется белый творожистый осадок, нерастворимый в азотной кислоте, но растворимый в аммиака растворе 10 %.

Б. К 1 мл раствора соли серебра (около 5 мг серебра-иона) прибавляют аммиака раствор до растворения образующегося вначале осадка, затем прибавляют 0,2 мл формальдегида раствора 35 % и нагревают; на стенках пробирки образуется блестящий налет металлического серебра.

Силикаты. Указанное в фармакопейной статье количество субстанции смешивают в свинцовом или платиновом тигле медной проволкой с около 10 мг натрия фторида и несколькими каплями серной кислоты концентрированной до получения жидкой суспензии. Тигель накрывают тонкой прозрачной пластиковой пластиной с подвешенной снизу каплей воды и осторожно нагревают. Вокруг капли образуется белое кольцо.

Сульфаты. К 2 мл раствора сульфата (5–50 мг сульфат-иона) прибавляют 0,5 мл бария хлорида раствора 5 %; образуется белый осадок, нерастворимый в разведённых неорганических кислотах.

Сульфиты

А. К 2 мл раствора сульфита (10–30 мг сульфит-иона) прибавляют 2 мл хлористоводородной кислоты разведенной 8,3 % и встряхивают; постепенно выделяется сернистый газ, обнаруживаемый по характерному резкому запаху.

Б. К 2 мл раствора сульфита (2–20 мг сульфит-иона) прибавляют 0,5 мл бария хлорида раствора 5 %; образуется белый осадок, растворимый в хлористоводородной кислоте разведенной 8,3 % (отличие от сульфатов).

Тартраты

А. К 1 мл раствора тартрата (около 20 мг тартрат-иона) прибавляют кристаллик калия хлорида, 0,5 мл спирта 96 %; образуется белый кристаллический осадок, растворимый в разведённых неорганических кислотах и растворах гидроксидов щелочных металлов.

Б. 0,25 мл раствора тартрата (около 5 мг тартрат-иона) нагревают с 1 мл серной кислоты концентрированной и несколькими кристаллами резорцина; через 15–30 с появляется вишнёво-красное окрашивание.

Фосфаты

А. К 1 мл раствора фосфата (10–30 мг фосфат-иона), нейтрализованного до pH около 7,0, прибавляют несколько капель серебра нитрата раствора 2 %; образуется желтый осадок, растворимый в азотной кислоте разведенной 16 % и аммиака растворе 10 %.

Б. К 1 мл раствора фосфата (10–30 мг фосфат-иона) прибавляют 1 мл аммония хлорида раствора 10 %, 1 мл аммиака раствора 10 % и 0,5 мл магния сульфата раствора 10 %; образуется белый кристаллический осадок, растворимый в разведённых неорганических кислотах.

В. К 1 мл раствора фосфата (10 – 30 мг фосфат-иона) в азотной кислоте разведенной 16 % прибавляют 2 мл аммония молибдата раствора 10 % и нагревают; образуется желтый кристаллический осадок, растворимый в аммиака растворе 10 %.

Хлориды. К 2 мл раствора хлорида (2–10 мг хлорид-иона) прибавляют 0,5 мл азотной кислоты разведенной 16 % и 0,5 мл серебра нитрата раствора 2 %; образуется белый творожистый осадок, нерастворимый в азотной кислоте разведенной 16 % и растворимый в аммиака растворе 10 %. Для солей органических оснований испытание растворимости образовавшегося осадка проводят после отфильтровывания и промывания осадка водой.

Цинк

А. К 2 мл нейтрального раствора соли цинка (5–20 мг цинк-иона) прибавляют 0,5 мл натрия сульфида раствора 2 %; образуется белый осадок, нерастворимый в уксусной кислоте разведенной 30 % и легко растворимый в хлористоводородной кислоте разведенной 8,3 %.

Б. К 2 мл раствора соли цинка (5–20 мг цинк-иона) прибавляют 0,5 мл раствора калия ферроцианида 5 %; образуется белый осадок, нерастворимый в хлористоводородной кислоте разведенной 8,3 %.

Цитраты

А. К 1 мл нейтрального раствора цитрата (2–10 мг цитрат-иона) прибавляют 1 мл кальция хлорида раствора 20 %; раствор остается прозрачным; при кипячении образуется белый осадок, растворимый в хлористоводородной кислоте разведенной 8,3 %.

Б. К лекарственному средству (1–2 мг цитрат-иона) прибавляют 0,5 мл уксусного ангидрида и нагревают; через 20–40 с появляется красное окрашивание.

Алюминий **ОФС.1.2.2.2.0001.15**

Вводится впервые

Для определения примеси алюминия в лекарственных средствах используют метод флуориметрии (метод 1) и метод атомно-абсорбционной спектрометрии (метод 2).

Метод 1

Испытуемый раствор. Раствор испытуемого образца, приготовленный, как указано в фармакопейной статье.

Эталонный раствор. Используют стандартный раствор алюминий-иона, указанный в фармакопейной статье.

Контрольный раствор. Используют растворитель, указанный в фармакопейной статье.

Испытуемый раствор помещают в делительную воронку, встряхивают с двумя порциями, по 20 мл каждая, раствора 5 г/л гидроксихинолина в хлороформе, затем с 10 мл этого же раствора. После прибавления каждой порции хлороформные слои отделяют, собирая в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора хлороформом до метки и перемешивают. Эталонный и контрольный растворы обрабатывают аналогично.

Измеряют интенсивность флуоресценции испытуемого (I_1), эталонного (I_2) и контрольного растворов (I_3) при длине волны возбуждения 392 нм и длине волны флуоресценции 518 нм. Флуоресценция испытуемого раствора ($I_1 – I_3$) не должна превышать флуоресценцию эталонного раствора ($I_2 – I_3$).

Стандартные растворы алюминий-иона

Стандартный раствор 200 мкг/мл алюминий-иона. Около 0,352 г (точная навеска) алюминия-калия сульфата додекагидрата, $AlK(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$, помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в воде, прибавляют 10 мл серной кислоты разведенной 9,8 %, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Стандартный раствор 2 мкг/мл алюминий-иона. Стандартный раствор (*200 мкг/мл алюминий-иона*) разводят водой в 100 раз непосредственно перед использованием.

Стандартный раствор 100 мкг/мл алюминий-иона. Около 8,947 г (точная навеска) алюминия хлорида гексагидрата, $AlCl_3 \cdot 6H_2O$, помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, растворяют в воде, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Раствор разводят водой в 10 раз непосредственно перед использованием.

Стандартный раствор 10 мкг/мл алюминий-иона. Около 1,390 г (точная навеска) алюминия нитрата нонагидрата, $Al(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$, помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в воде, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Раствор разводят водой в 100 раз непосредственно перед использованием.

Примечания.

1. Определение содержания $AlK(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$ в алюминия-калия сульфате. Около 0,45 г (точная навеска) алюминия-калия сульфата растворяют в 20 мл воды и проводят комплексонометрическое титрование алюминия.

1 мл натрия эдетата раствора 0,05 М соответствует 23,72 мг $AlK(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$.

2. Определение содержания $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ в алюминия хлориде. Около 0,25 г (точная навеска) алюминия хлорида растворяют в 25 мл воды и проводят комплексонометрическое титрование алюминия.

1 мл натрия эдетата раствора 0,05 М соответствует 12,07 мг $AlCl_3 \cdot 6H_2O$.

3. Определение содержания $Al(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$ в алюминия нитрате. Около 0,35 г (точная навеска) алюминия нитрата растворяют в 20 мл воды и проводят комплексонометрическое титрование алюминия.

1 мл натрия эдетата раствора 0,05 М соответствует 18,76 мг $Al(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$.

Метод 2

Применяют для субстанций, предназначенных для использования в гемодиализе.

Испытуемый раствор. Если не указано в фармакопейной статье, точную навеску испытуемой субстанции, содержащую от 1,2 до 3,8 мкг алюминий-иона, помещают в пластиковую мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл воды и обрабатывают ультразвуком в течение 30 мин. Прибавляют 4 мл азотной кислоты концентрированной, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Эталонные растворы. Алюминиевую проволоку опускают в хлористоводородной кислоты раствор 6 М, нагретый до 80 ºС, на несколько минут. Около 0,1 г (точная навеска) обработанной проволоки растворяют в смеси 10 мл хлористоводородной кислоты 25 % и 2 мл азотной кислоты концентрированной при температуре около 80 ºС в течение примерно 30 мин. Продолжают нагревание, пока объем смеси не уменьшится приблизительно до 4 мл. Охлаждают смесь до комнатной температуры и прибавляют 4 мл воды. Выпаривают при нагревании до объема приблизительно 2 мл. Раствор охлаждают, переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Затем 10 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. 1,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Далее 1,0, 2,0 и 4,0 мл полученного раствора помещают в отдельные мерные колбы вместимостью 100 мл, доводят объемы растворов разбавленным раствором азотной кислоты (см. Примечание) до метки и перемешивают (0,01, 0,02 и 0,04 мкг/мл алюминий-иона, соответственно).

Измеряют поглощение испытуемого и эталонных растворов при спектральной линии излучения алюминия при 309,3 нм на атомно-абсорбционном спектрометре, оснащенном лампой с алюминиевым полым катодом, беспламенной электрической печью, используя разбавленный раствор азотной кислоты в качестве контрольного раствора. Определяют концентрацию алюминия в испытуемом растворе по градуировочному графику, построенному по эталонным растворам, и рассчитывают содержание алюминия в испытуемой субстанции.

Примечание. Приготовление разбавленного раствора азотной кислоты. 40 мл азотной кислоты концентрированной помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Аммоний **ОФС.1.2.2.2.0002.15**

Взамен ГФ X

Взамен ст. ГФ XI, вып.1

Определение примеси ионов аммония в лекарственных средствах основано на образовании в зависимости от их концентрации желто-бурого осадка или желтого окрашивания со щелочным раствором калия тетрайодомеркурата (2) (реактивом Несслера). Предельная чувствительность реакции 0,3 мкг/мл аммоний-иона. При концентрации аммоний-иона 2 мкг/мл наблюдается выраженное желтое окрашивание.

Испытуемый раствор. 10 мл раствора, приготовленного, как указано в фармакопейной статье.

Эталонный раствор. 10 мл стандартного раствора аммоний-иона (2 мкг/мл).

К испытуемому и эталонному растворам прибавляют по 0,15 мл реактива Несслера и перемешивают. Через 5 мин сравнивают окраску растворов.

Окраска, появившаяся в испытуемом растворе, не должна превышать окраску эталонного раствора.

Определение в лекарственных средствах, содержащих щелочноземельные и тяжелые металлы

Испытуемый раствор. Навеску испытуемого образца, указанную в фармакопейной статье, растворяют в возможно меньшем количестве воды, прибавляют при охлаждении 2 мл натрия гидроксида раствора 10 % и 2 мл натрия карбоната раствора 10 %. Раствор разбавляют водой до требуемой

концентрации, взбалтывают и фильтруют. Отбирают 10 мл полученного фильтрата.

Эталонный раствор. 10 мл стандартного раствора аммоний-иона (2 мкг/мл).

К испытуемому и эталонному растворам прибавляют по 0,15 мл реактива Несслера и перемешивают. Через 5 мин сравнивают окраску растворов.

Определение в лекарственных средствах, содержащих более 0,03 % примеси железа

Испытуемый раствор. К 10 мл раствора, приготовленного, как указано в фармакопейной статье, прибавляют две капли натрия гидроксида раствора 10 % и 3 мл калия-натрия тартрата раствора 20 %, перемешивают.

Эталонный раствор. К 10 мл стандартного раствора аммоний-иона (2 мкг/мл аммоний-иона) прибавляют две капли натрия гидроксида раствора 10 % и 3 мл калия-натрия тартрата раствора 20 %.

К испытуемому и эталонному растворам прибавляют по 0,15 мл реактива Несслера и перемешивают. Через 5 мин сравнивают окраску растворов.

Стандартные растворы аммоний-иона

Стандартный раствор 200 мкг/мл аммоний-иона. Около 0,593 г (точная навеска) аммония хлорида, высушенного в эксикаторе над серной кислотой до постоянной массы, помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, растворяют в воде, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Стандартный раствор 2 мкг/мл аммоний-иона. 1 мл стандартного раствора (200 мкг/мл аммоний-иона) помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

Кальций	**ОФС.1.2.2.2.0003.15**
	Взамен ГФ X
	Взамен ст. ГФ XI, вып.1

Растворы солей кальция в зависимости от их концентрации дают с раствором аммония оксалата помутнение раствора или белый мелкокристаллический осадок, не исчезающие при прибавления уксусной кислоты, но легко растворимые при прибавлении хлористоводородной или азотной кислоты. Предельная чувствительность реакции 3,5 мкг/мл кальций-иона. При концентрации кальций-иона 30 мкг/мл наблюдается помутнение раствора.

Метод 1

Испытуемый раствор. 10 мл раствора, приготовленного, как указано в фармакопейной статье.

Эталонный раствор. 10 мл стандартного раствора кальций-иона (30 мкг/мл).

К испытуемому и эталонному растворам прибавляют по 1 мл 10 % раствора аммония хлорида, 1 мл 10 % раствора аммиака и 1 мл 4 % раствора аммония оксалата, перемешивают.

Через 10 мин сравнивают мутность растворов. Мутность, появившаяся в испытуемом растворе, не должна превышать мутность эталонного раствора.

Метод 2

При приготовлении всех растворов, применяемых в данном испытании, должна использоваться вода очищенная, полученная методом дистилляции.

В каждую из двух пробирок помещают по 0,2 мл стандартного раствора кальций-иона спиртового (100 мкг/мл) и 1 мл 4 % раствора аммония оксалата.

Испытуемый раствор. Через 1 мин в одну из пробирок прибавляют смесь 1 мл уксусной кислоты разведенной 12 % и 15 мл раствора, содержащего указанное в фармакопейной статье количество испытуемого вещества, и встряхивают.

Эталонный раствор. Во вторую пробирку также через 1 мин прибавляют смесь 10 мл стандартного раствора кальций-иона (10 мкг/мл), 1 мл уксусной кислоты разведенной 12 % и 5 мл воды.

Через 15 мин сравнивают мутность растворов. Мутность, появившаяся в испытуемом растворе, не должна превышать мутность эталонного раствора.

Стандартные растворы кальций-иона

Стандартный раствор 3000 мкг/мл кальций-иона. Около 0,749 г (точная навеска) кальция карбоната, высушенного при температуре от 100 до 105 °С до постоянной массы, помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, добавляют 10 мл воды, взбалтывают, прибавляют постепенно хлористоводородную кислоту разведенную 8,3 % до растворения; после удаления пузырьков углерода диоксида доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Стандартный раствор 30 мкг/мл кальций-иона. 1 мл стандартного раствора (3000 мкг/мл кальций-иона) помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

Стандартный раствор 100 мкг/мл кальций-иона спиртовой. Около 2,50 г (точная навеска) кальция карбоната, высушенного при температуре от 100 до 105 °С до постоянной массы, помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, прибавляют 12 мл уксусной кислоты разведенной 30 %, дегазируют, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Раствор разводят спиртом 96 % в 10 раз непосредственно перед использованием.

Стандартный раствор 10 мкг/мл кальций-иона. Около 0,624 г (точная навеска) кальция карбоната, высушенного при температуре от 100 до 105 °С до постоянной массы, помещают в мерную колбу вместимостью 250 мл, прибавляют 3 мл уксусной кислоты разведенной 30 %, доводят объем раствора водой до метки, дегазируют и перемешивают. Раствор разводят водой в 100 раз непосредственно перед использованием.

Мышьяк **ОФС.1.2.2.2.0004.15**

Взамен ГФ X

Взамен ст. ГФ XI, вып.1

Методы определения предельного содержания мышьяка в лекарственных средствах основаны на восстановлении соединений мышьяка до мышьяковистого водорода с последующим получением желто-бурого продукта реакции (метод 1) или до металлического мышьяка (метод 2).

Могут быть использованы другие валидированные методы.

МЕТОД 1

Прибор (рисунок) состоит из конической колбы (1) вместимостью 100 мл, закрывающейся пробкой, через которую проходит стеклянная трубка (2), расширенная в верхней части, длина расширенной части трубки 120 – 150 мм, внутренний диаметр 10 – 12 мм. В нижнюю часть трубки помещают тампон (3) из 50 – 60 мг неплотно упакованной свинцово-ацетатной ваты. Верхняя расширенная часть трубки закрыта пробкой, через которую проходит вторая стеклянная трубка (4) длиной 100 мм и внутренним диаметром 5 – 6 мм. Нижнюю часть второй трубки закрывают полоской ртутно-хлоридной или ртутно-бромидной бумаги (5) шириной 6 мм. Верхние края полоски закреплены между стенками первой трубки и пробкой.

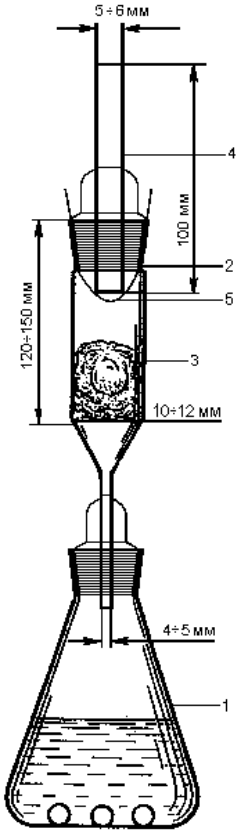


Рисунок – Прибор для определения мышьяка в лекарственных препаратах

Испытуемый раствор. В колбу 1 прибора помещают соответствующим образом приготовленное вещество (см. «Подготовка образцов для определения по методу 1»).

Эталонный раствор. В колбу (1) другого такого же прибора помещают те же количества реактивов и в тех же условиях, что и при подготовке испытуемого раствора, и 0,5 мл стандартного раствора мышьяк-иона (1 мкг/мл).

Методика

К испытуемому и эталонному растворам прибавляют 10 – 12 капель олова(II) хлорида раствора 10 %, 2 г цинка активированного и сразу закрывают колбу пробкой со вставленной в нее верхней частью прибора. Содержимое колбы осторожно взбалтывают и оставляют на 1 ч. При этом температура реакционной смеси не должна превышать 40 °С. Через 1 ч пинцетом извлекают из прибора полоску бумаги и помещают ее в стакан с калия йодида раствором 10 % . Через 10 мин раствор калия йодида сливают,

полоску бумаги тщательно промывают несколько раз водой путем декантации в том же стакане и сушат между листами фильтровальной бумаги.

Полоска бумаги, извлеченная из прибора с испытуемым раствором, не должна быть окрашенной или ее окраска не должна быть интенсивнее окраски полоски бумаги, извлеченной из прибора с эталонным раствором.

Подготовка образцов для определения по методу 1

Органические препараты

Навеску испытуемого вещества, указанную в фармакопейной статье, помещают в колбу (1) прибора, прибавляют 10 мл серной кислоты концентрированной и кипятят до обугливания, но не менее 40 мин. Затем в горячий раствор прибавляют по стенке колбы водорода пероксид порциями по 4 мл до обесцвечивания раствора, нагревают еще от 10 до 15 мин и после охлаждения прибавляют 20 мл воды, не допуская сильного разогревания.

Неорганические препараты

а) препараты, не содержащие азотной кислоты, нитратов и нитритов, а также соединения, не выделяющие в условиях проведения испытаний галогенов, сероводорода, серы диоксида и фосфинов: навеску испытуемого вещества, указанную в фармакопейной статье, помещают в колбу (1) прибора и прибавляют 20 мл хлористоводородной кислоты разведенной 8,3 %.

б) азотная кислота, нитраты и нитриты, а также соединения, выделяющие в условиях испытания галогены, сероводород, серы диоксид и фосфины: навеску испытуемого вещества, указанную в фармакопейной статье, помещают в колбу (1) прибора, прибавляют 10 мл серной кислоты концентрированной и кипятят 40 мин. Затем в горячий раствор прибавляют по стенке колбы 4 мл водорода пероксида, нагревают еще от 10 до 15 мин и после охлаждения прибавляют 20 мл воды, не допуская сильного разогревания.

Примечания.

1. Приготовление ртутно-хлоридной бумаги. Беззольную фильтровальную бумагу смачивают насыщенным спиртовым раствором ртути(II) хлорида и дают спирту испариться. Повторяют эту операцию 4 – 5 раз, после чего бумагу высушивают при комнатной температуре.

Хранят в хорошо закупоренных банках темного стекла.

2. Приготовление ртутно-бромидной бумаги. Высушенную ртутно-бромидную бумагу нарезают полосками шириной 6 мм.

3. Активирование цинка можно проводить следующим образом: кусочки гранулированного цинка, не содержащего мышьяка, обрабатывают хлористоводородной кислотой 25 % для очистки его поверхности, промывают водой и хранят под водой.

4. Отдельные отклонения от вышеописанных методов приготовления испытуемого раствора указывают в фармакопейной статье.

5. Мышьяковистый водород очень ядовит. Испытание следует проводить в вытяжном шкафу.

МЕТОД 2

Метод 2 применяют в случае определения наряду с мышьяком селена и теллура, а также при определении мышьяка в препаратах сурьмы, висмута, ртути и серебра; в препаратах, содержащих сульфиды и сульфиты, и в некоторых других случаях, указанных в фармакопейных статьях.

Возможны два варианта проведения испытаний: способ А (без использования эталонного раствора) – по побурению раствора или образованию бурого осадка; и способ Б – сравнением интенсивности образовавшейся окраски с окраской эталонного раствора.

Способ А

Предельная чувствительность метода составляет 0,01 мг мышьяка в 10 мл реакционной смеси. Если во взятой навеске препарата содержится 0,01 мг мышьяка, то при испытании по этому способу получается заметное темно-бурое окрашивание жидкости.

Методика

Навеску вещества после предварительной обработки, описанной в фармакопейной статье, вносят в пробирку, прибавляют 5 мл раствора натрия гипофосфита, помещают пробирку в кипящую водяную баню и нагревают в течение 15 мин.

Не должно наблюдаться ни побурения, ни образования бурого осадка.

В случае побурения или образования бурого осадка в пробирку после охлаждения прибавляют 3 мл воды, 5 мл эфира и тщательно взбалтывают. При наличии мышьяка на границе жидкостей образуется бурая пленка.

Способ Б

Испытуемый раствор. Навеску вещества, указанную в фармакопейной статье, помещают в пробирку для испытания, содержащую 4 мл хлористоводородной кислоты концентрированной и около 5 мг калия йодида.

Эталонный раствор. В пробирку, содержащую 4 мл хлористоводородной кислоты концентрированной и около 5 мг калия йодида, прибавляют 0,5 мл стандартного раствора мышьяк-иона (10 мкг/мл).

Методика

К испытуемому и эталонному растворам прибавляют по 3 мл раствора натрия гипофосфита и нагревают на водяной бане в течение 15 мин, периодически перемешивая.

Интенсивность окраски испытуемого раствора не должна превышать интенсивность окраски эталонного раствора.

Стандартные растворы мышьяк-иона

Стандартный раствор 100 мкг/мл мышьяк-иона. Около 0,0132 г (точная навеска) мышьяка(III) оксида помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 10 мл натрия гидроксида раствора 0,1 М, нейтрализуют серной кислоты раствором 0,05 М, доводят объем раствора свежепрокипяченной и охлажденной водой до метки и перемешивают.

Стандартный раствор 10 мкг/мл мышьяк-иона. 10 мл стандартного раствора (100 мкг/мл мышьяк-иона) помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора свежепрокипяченной и охлажденной водой до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

Стандартный раствор 1 мкг/мл мышьяк-иона.1 мл стандартного

раствора (100 мкг/мл мышьяк-иона) помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора свежепрокипяченной и охлажденной водой до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

Ртуть	**ОФС.1.2.2.2.0005.15**
	Вводится впервые

Описанные ниже методы определения примеси ртути в лекарственных средствах основаны на экстракционно-фотометрическом определении ртуть(II)-иона с дитизоном (метод 1) и определении методом атомно-абсорбционной спектрометрии с беспламенной атомизацией – методом «холодного пара» (метод 2).

Метод 1

Испытуемый раствор. В делительную воронку объемом 100 мл помещают 15 мл водного раствора испытуемого образца, приготовленного, как указано в фармакопейной статье, и прибавляют 5 мл серной кислоты раствора 1 М.

Эталонный раствор. В делительную воронку объемом 100 мл помещают 10 мл воды, 5 мл стандартного раствора ртуть(II)-иона (1 мкг/мл) и 5 мл серной кислоты раствора 1 М.

Контрольный раствор. В делительную воронку объемом 100 мл помещают 15 мл воды и 5 мл серной кислоты раствора 1 М.

В каждую из воронок прибавляют по 5 мл уксусной кислоты раствора 6 М и перемешивают. Затем добавляют по 10 мл дитизона раствора 0,00125 % в хлороформе, взбалтывают в течение 2 мин, дают отстояться и фильтруют органическую фазу через бумажный фильтр.

Измеряют оптическую плотность фильтратов испытуемого и эталонного растворов относительно фильтрата контрольного раствора в

максимуме поглощения при длине волны 498 нм.

Оптическая плотность испытуемого раствора не должна превышать оптической плотности эталонного раствора.

Стандартные растворы ртуть(II)-иона

Стандартный раствор 100 мкг/мл ртуть(II)-иона. Около 0,108 г (точная навеска) ртути(II) оксида помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, растворяют в 10 мл воды с добавлением 1 мл азотной кислоты концентрированной, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Хранят в защищенном от света месте.

Стандартный раствор 1 мкг/мл ртуть(II)-иона. 1,0 мл стандартного раствора (100 мкг/мл ртуть(II)-иона) помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

Метод 2

Метод беспламенной атомизации (метод «холодного пара») заключается в восстановлении ионов ртути до металлической ртути, получении с помощью генератора атомного пара паров ртути, последующей их отгонке потоком воздуха или инертного газа в абсорбционную ячейку атомно-абсорбционного спектрометра и измерении поглощения монохроматического излучения на резонансной длине волны 253,7 нм от ртутной лампы.

Испытуемый раствор. Точную навеску испытуемого вещества, указанную в фармакопейной статье, помещают в мерный стакан вместимостью 100 мл и растворяют в 35 мл воды, нагревают при необходимости. Прибавляют 2 капли фенолфталеина раствора 1 % и в случае отсутствия окраски прибавляют по каплям натрия гидроксида раствор 1 М до слабо-розового окрашивания, а в случае розовой окраски раствора – серной кислоты раствор 0,5 М до обесцвечивания при постоянном перемешивании.

Эталонный раствор. 2,0 мл стандартного раствора ртуть(II)-иона (1 мкг/мл) помещают в мерный стакан вместимостью 100 мл и прибавляют

35 мл воды.

Контрольный раствор. В мерный стакан вместимостью 100 мл помещают 35 мл воды.

К каждому из полученных растворов добавляют 3 мл серной кислоты концентрированной и 1 мл калия перманганата раствора 5 %. Накрывают стакан часовым стеклом, кипятят несколько секунд и охлаждают. Избыток калия перманганата разрушают прибавлением по каплям гидроксиламина гидрохлорида раствора 10 % до обесцвечивания раствора.

Раствор разбавляют водой до 100 мл, прибавляют 2 мл раствора олова(II) хлорида и помещают в генератор атомного пара. Скорость потока воздуха или инертного газа устанавливают таким образом, чтобы избежать бурного выделения пузырьков из раствора.

Измеряют поглощение испытуемого и эталонного растворов при длине волны 253,7 нм.

Поглощение испытуемого раствора не должно превышать поглощение эталонного раствора.

Примечания.

1. Приготовление раствора олова(II) хлорида. 10 г олова(II) хлорида помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 20 мл горячей хлористоводородной кислоты концентрированной, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Срок годности раствора – 1 неделя.

2. В случае трудносжигаемых веществ предварительно проводят разложение вещества смесью концентрированных азотной и серной кислот в присутствии водорода пероксида. Некоторые вещества могут реагировать с водорода пероксидом с взрывом. Необходимо соблюдать меры предосторожности.

Стандартные растворы ртуть(II)-иона

Стандартный раствор 1 мг/мл ртуть(II)-иона. Около 0,1354 г (точная навеска) ртути(II) хлорида помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в серной кислоты растворе 1 М, доводят тем же растворителем до метки и перемешивают. Хранят в защищенном от света месте.

Стандартный раствор 1 мкг/мл ртуть(II)-иона. 1,0 мл стандартного

раствора (1 мг/мл ртуть(II)-иона) помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, доводят объем раствора серной кислоты раствором 1 М до метки и перемешивают. Раствор готовят непосредственно перед использованием.

Селен	**ОФС.1.2.2.2.0006.15** **Вводится впервые**

Испытание на предельное содержание селена в лекарственных средствах проводят спектрофотометрическим методом, основанным на проведении реакции с 2,3-диаминонафталином после предварительного сжигания вещества в колбе с кислородом (ОФС «Метод сжигания в колбе с кислородом»).

Испытуемый раствор. В колбу для сжигания с кислородом вместимостью 1000 мл помещают от 100 до 200 мг (точная навеска) испытуемого вещества, если не указано иначе в фармакопейной статье, 25 мл смеси азотная кислота концентрированная – вода (1:30) и проводят сжигание. Для веществ, сгорающих не полностью и образующих сажу, рекомендуется прибавление магния оксида, что должно быть указано в фармакопейной статье. После завершения сжигания пробку, держатель образца и стенки колбы промывают 10 мл воды. Раствор переносят с помощью 20 мл воды в стакан вместимостью 150 мл и осторожно нагревают до кипения. Кипятят в течение 10 мин и оставляют при комнатной температуре до охлаждения.

Эталонный раствор. 6 мл стандартного раствора селен-иона (1 мкг/мл) переносят в стакан вместимостью 150 мл, добавляют 25 мл смеси азотная кислота концентрированная – вода (1:30) и 25 мл воды.

Контрольный раствор. К 25 мл смеси азотная кислота концентрированная – вода (1:30) прибавляют 25 мл воды и перемешивают.

Методика

К испытуемому, эталонному и контрольному растворам прибавляют смесь аммиака раствор концентрированный – вода (1:2) до pH (2,0 ± 0,2). Растворы разбавляют водой до объема 60 мл и переносят в защищенные от света делительные воронки с помощью 10 мл воды. Добавляют по 200 мг гидроксиламина гидрохлорида, закрывают пробками и встряхивают до растворения. Сразу после растворения прибавляют по 5 мл раствора 2,3-диаминонафталина, закрывают пробками и снова встряхивают. Оставляют на 100 мин, затем прибавляют по 5 мл циклогексана, энергично встряхивают в течение 2 мин и дают слоям разделиться.

Водные слои отбрасывают, циклогексановые экстракты центрифугируют для удаления диспергированной воды. Измеряют оптические плотности циклогексановых экстрактов испытуемого и эталонного растворов в кювете с толщиной слоя 1 см в максимуме поглощения при длине волны 380 нм, используя циклогексановый экстракт контрольного раствора в качестве раствора сравнения.

Оптическая плотность испытуемого раствора не должна превышать оптическую плотность эталонного раствора при навеске испытуемого вещества 200 мг. При проведении испытания с 100 мг испытуемого вещества оптическая плотность испытуемого раствора не должна превышать половину оптической плотности эталонного раствора.

Примечание**.** Приготовление раствора 2,3-диаминонафталина. Растворяют 100 мг 2,3-диаминонафталина и 500 мг гидроксиламина гидрохлорида в 100 мл 0,1 М раствора хлористоводородной кислоты. Раствор используют свежеприготовленным.

Стандартный раствор селен-иона

Стандартный раствор 1 мкг/мл селен-иона. 40 мг (точная навеска) металлического селена помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, прибавляют 100 мл смеси азотная кислота концентрированная – вода (1:2) и перемешивают периодически до полного растворения, нагревая при

необходимости на водяной бане. Доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. 5 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 200 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Сульфаты	**ОФС.1.2.2.2.0007.15**
	Взамен ГФ X
	Взамен ст. ГФ XI, вып.1

Определение содержания сульфат-ионов основано на их способности образовывать с растворами солей бария помутнение раствора или белый осадок, нерастворимые в кислотах. Предельная чувствительность реакции 3 мкг/мл сульфат-иона. При концентрации 10 мкг/мл сульфат-иона через 10 мин наблюдают помутнение раствора.

Метод 1

Испытуемый раствор. 10 мл раствора, приготовленного, как указано в фармакопейной статье.

Эталонный раствор 10 мл стандартного раствора сульфат-иона (10 мкг/мл).

К испытуемому и эталонному растворам прибавляют по 0,5 мл хлористоводородной кислоты разведенной 8,3 % и 1 мл бария хлорида раствора 5 %, перемешивают.

Через 10 мин сравнивают мутность испытуемого и эталонного растворов. Мутность, появившаяся в испытуемом растворе, не должна превышать мутность эталонного раствора.

Метод 2

К 4,5 мл стандартного раствора сульфат-иона спиртового (10 мкг/мл) прибавляют 3 мл бария хлорида раствора 25 %, встряхивают и выдерживают в течение 1 мин.

Испытуемый раствор. К 2,5 мл описанного выше раствора прибавляют 15 мл раствора испытуемого образца, приготовленного, как указано в фармакопейной статье, и 0,5 мл уксусной кислоты разведенной 30 %.

Эталонный раствор готовят с теми же количествами реактивов и в тех же условиях, используя вместо раствора испытуемого образца 15 мл стандартного раствора сульфат-иона (10 мкг/мл).

Через 5 мин сравнивают мутность испытуемого и эталонного растворов. Мутность, появившаяся в испытуемом растворе, не должна превышать мутность эталонного раствора.

Стандартные растворы сульфат-иона

Стандартный раствор 1000 мкг/мл сульфат-иона спиртовой. Около 0,1814 г (точная навеска) калия сульфата, высушенного при температуре от 100 до 150 °С до постоянной массы, помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в спирте 30 %, доводят объем раствора спиртом 30 % до метки и перемешивают.

Стандартный раствор 10 мкг/мл сульфат-иона спиртовой. 1 мл стандартного раствора (1000 мкг/мл сульфат-иона) помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора спиртом 30 % до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

Стандартный раствор 1000 мкг/мл сульфат-иона. Около 0,1814 г (точная навеска) калия сульфата, высушенного при температуре от 100 до 150 °С до постоянной массы, помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в воде, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Стандартный раствор10 мкг/мл сульфат-иона. 1 мл стандартного раствора (1000 мкг/мл сульфат-иона) помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

Фосфаты	**ОФС.1.2.2.2.0008.15** **Вводится впервые**

Определение фосфатов основано на их способности образовывать с молибдат-ионами в присутствии восстановителя соединения синего цвета – молибденовую синь.

Испытуемый раствор. 100 мл испытуемого раствора, имеющего нейтральную реакцию, приготовленного, как указано в фармакопейной статье.

Эталонный раствор. К 2 мл стандартного раствора фосфат-иона (5 мкг/мл) прибавляют 98 мл воды.

К 20 мл испытуемого и 20 мл эталонного растворов прибавляют по 4 мл сульфомолибденового реактива 2,5 %, встряхивают, прибавляют по 0,1 мл раствора олова(II) хлорида, перемешивают и через 10 мин сравнивают окраски.

Синяя окраска, появившаяся в испытуемом растворе, не должна превышать окраску эталонного раствора.

Стандартный раствор фосфат-иона

Стандартный раствор 5 мкг/мл фосфат-иона. Около 0,716 г (точная навеска) калия фосфата однозамещенного, в пересчете на безводный KH_2PO_4, помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, растворяют в воде и доводят объем раствора водой до метки. Разводят водой в 100 раз непосредственно перед использованием.

Хлориды	**ОФС.1.2.2.2.0009.15**
	Взамен ГФ X
	Взамен ст. ГФ XI, вып.1

Растворы хлоридов в зависимости от их концентрации взаимодействуют с раствором серебра нитрата с образованием белого творожистого осадка, с появлением белого помутнения или опалесценции, не исчезающих при прибавлении азотной кислоты и легко исчезающих при прибавлении раствора аммиака. Предел чувствительности реакции 0,1 мкг/мл хлорид-иона. При концентрации хлорид-иона 2 мкг/мл получают хорошо заметную опалесценцию.

Испытуемый раствор. 10 мл раствора, приготовленного, как указано в фармакопейной статье.

Эталонный раствор. 10 мл стандартного раствора хлорид-иона (2 мкг/мл).

К испытуемому и эталонному растворам прибавляют по 0,5 мл азотной кислоты и 0,5 мл серебра нитрата раствора 2 %. Перемешивают и помещают пробирки в темное место. Через 5 мин сравнивают опалесценцию растворов.

Опалесценция, появившаяся в испытуемом растворе, не должна превышать опалесценцию эталонного раствора.

Стандартные растворы хлорид-иона

Стандартный раствор 400 мкг/мл хлорид-иона. Около 0,659 г (точная навеска) натрия хлорида, доведенного до постоянной массы путем

прокаливания при 500 – 600 °С, помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, растворяют в воде, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Стандартный раствор 2 мкг/мл хлорид-иона. 5 мл стандартного раствора (400 мкг/мл хлорид-иона) помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

Цинк	**ОФС.1.2.2.2.0010.15** **Взамен ГФ X** **Взамен ст. ГФ XI, вып. 1**

Определение примесей солей цинка в лекарственных средствах основано на образовании с раствором калия ферроцианида, в зависимости от концентрации ионов цинка, белого помутнения раствора или белого осадка, не растворимых в разведенных кислотах. Предельная чувствительность реакции 1 мкг/мл цинк-иона. При концентрации цинк-иона 5 мкг/мл наблюдают помутнение раствора.

Испытуемый раствор. 10 мл раствора испытуемого образца, приготовленного, как указано в фармакопейной статье.

Эталонный раствор. 10 мл стандартного раствора цинк-иона (5 мкг/мл).

К испытуемому и эталонному растворам прибавляют по 2 мл хлористоводородной кислоты 25 % и по 0,2 мл калия ферроцианида раствора 5 %. Через 10 мин сравнивают мутность растворов. Мутность, появившаяся в испытуемом растворе, не должна превышать мутность эталонного раствора.

Примечание. В случае появления в испытуемом растворе синего окрашивания, следует предварительно отделить ионы железа. Для этого к испытуемому раствору, нагретому до кипения, прибавляют аммиака раствор 10 % до отчетливого запаха, смесь фильтруют и проводят определение цинк-ионов в фильтрате.

Стандартные растворы цинк-иона

Стандартный раствор 1000 мкг/мл цинк-иона. Около 0,625 г (точная навеска) цинка оксида, предварительно прокаленного до постоянной массы,

растворяют в 10 мл азотной кислоты, переносят в мерную колбу вместимостью 500 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Стандартный раствор 5 мкг/мл цинк-иона. 1 мл стандартного раствора (1000 мкг/мл цинк-иона) помещают в мерную колбу вместимостью 200 мл, прибавляют 4 капли азотной кислоты, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

Железо	**ОФС.1.2.2.2.0011.15**
	Взамен ГФ X
	Взамен ст. ГФ XI, вып. 1
	Взамен ГФ XII, ч.1, ОФС 42-0058-07

Химические методы определения примеси железа в лекарственных средствах основаны на образовании окрашенных растворов при взаимодействии ионов железа с различными реагентами.

С сульфосалициловой кислотой соли двух- и трехвалентного железа в зависимости от концентрации образуют в аммиачной среде желтые или коричнево-красные растворы сульфосалицилатных комплексов (метод 1); в зависимости от природы испытуемого образца используются различные модификации этого метода.

С тиогликолевой кислотой в аммиачной среде (метод 2) или с аммония тиоцианатом в кислой среде (метод 3) соли железа в зависимости от концентрации и степени окисления образуют розовые или красные растворы соответствующих соединений.

После добавления соответствующих реактивов (с учетом используемого метода) сравнивают интенсивность окраски испытуемого раствора с окраской эталонного раствора. Окраска, появившаяся в испытуемом растворе, не должна превышать окраску эталонного раствора.

Предельно допустимое содержание солей железа, метод испытания, условия подготовки испытуемого образца и концентрация стандартного раствора железа должны быть указаны в фармакопейной статье.

Определение железа в растворах лекарственных средств

Метод 1

Испытуемый раствор. 10 мл раствора испытуемого образца, приготовленного, как указано в фармакопейной статье.

Эталонный раствор. 10 мл стандартного раствора 3 мкг/мл железо(III)-иона.

К испытуемому и эталонному растворам прибавляют по 2 мл сульфосалициловой кислоты раствора 10 %, 1 мл аммиака раствора 10 %, перемешивают и через 5 мин сравнивают окраску растворов.

Определение солей железа в соединениях магния

Испытуемый раствор. 10 мл раствора испытуемого образца, приготовленного, как указано в фармакопейной статье.

Эталонный раствор. 10 мл стандартного раствора 3 мкг/мл железо(III)-иона.

К испытуемому и эталонному растворам прибавляют по 2 мл сульфосалициловой кислоты раствора 10 %, 0,5 мл аммония хлорида раствора 10,7 %, 1 мл аммиака раствора 10 % и через 5 мин сравнивают окраску растворов.

Определение солей железа в соединениях алюминия

Испытуемый раствор. 10 мл раствора испытуемого образца, приготовленного, как указано в фармакопейной статье.

Эталонный раствор. 10 мл стандартного раствора 3 мкг/мл железо(III)-иона.

К испытуемому и эталонному растворам прибавляют по 5 мл сульфосалициловой кислоты раствора 10 %, 2 мл натрия гидроксида раствора 10 % и через 5 мин сравнивают окраску растворов.

Метод 2

Испытуемый раствор. 10 мл раствора испытуемого образца, приготовленного, как указано в фармакопейной статье.

Эталонный раствор. 10 мл стандартного раствора 1 мкг/мл железо(III)-иона.

К испытуемому и эталонному растворам прибавляют по 2 мл лимонной кислоты раствора 20 % и 0,1 мл тиогликолевой кислоты, перемешивают, добавляют аммиака раствор 10 % до щелочной реакции по универсальной индикаторной бумаге, доводят объем раствора водой до 20 мл, перемешивают и через 5 мин сравнивают окраску растворов.

Метод 3

Испытуемый раствор. 10 мл раствора испытуемого образца, приготовленного, как указано в фармакопейной статье.

Эталонный раствор. К 3 мл стандартного раствора 1 мкг/мл железо(III)-иона прибавляют 7 мл воды.

К испытуемому и эталонному растворам прибавляют по 0,5 мл хлористоводородной кислоты концентрированной, 10 мг аммония персульфата и 1,5 мл аммония тиоцианата раствора 15 %, перемешивают и через 5 мин сравнивают окраску растворов.

Определение солей железа в зольном остатке органических соединений

Испытуемый раствор. Зольный остаток, полученный после сжигания навески испытуемого образца с серной кислотой концентрированной, обрабатывают при нагревании на водяной бане 2 мл хлористоводородной кислоты концентрированной и прибавляют 2 мл воды.

Содержимое тигля, если нужно, фильтруют в пробирку, тигель и фильтр промывают 3 мл воды, присоединяя промывные воды к фильтрату. Раствор нейтрализуют аммиаком водным (контроль по универсальной индикаторной бумаге) и доводят объем раствора водой до 10 мл.

Эталонный раствор. В тигель помещают серную кислоту в количестве, взятом для сжигания испытуемого образца, и далее поступают как с

испытуемым образцом, но объем раствора доводят водой до 9 мл, после чего прибавляют 1 мл стандартного раствора железо(III)-иона (30, 10 или 3 мкг/мл в зависимости от метода определения).

Далее определение проводят любым из описанных выше методов определения железа в растворах лекарственных средств.

Стандартные растворы железо(III)-иона

Стандартный раствор 200 мкг/мл железо(III)-иона. 0,8634 г железа(III) аммония сульфата или количество железа(III) аммония сульфата, соответствующее 0,1000 г железо(III)-иона и рассчитанное по формуле (1), растворяют в 25 мл раствора серной кислоты разведенной 9,8 % при нагревании, переносят количественно в мерную колбу вместимостью 500 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

$$0{,}1000/Q, \quad (1)$$

где Q – содержание железо(III)-иона в граммах в 1 г железа(III) аммония сульфата (см. примечание).

Стандартный раствор 30 мкг/мл железо(III)-иона. 15 мл стандартного раствора (200 мкг/мл железо(III)-иона) перед использованием помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем водой до метки и перемешивают.

Стандартный раствор 20 мкг/мл железо(III)-иона. 10 мл стандартного раствора (200 мкг/мл железо(III)-иона) перед использованием помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем водой до метки и перемешивают.

Стандартный раствор 10 мкг/мл железо(III)-иона. 5 мл стандартного раствора (200 мкг/мл железо(III)-иона) перед использованием помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем водой до метки и перемешивают.

Стандартный раствор 3 мкг/мл железо(III)-иона. 15 мл стандартного раствора (20 мкг/мл железо(III)-иона) перед использованием помещают в

мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем водой до метки и перемешивают.

Стандартный раствор 1 мкг/мл железо(III)-иона. 5 мл стандартного раствора (20 мкг/мл железо(III)-иона) перед использованием помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем водой до метки и перемешивают.

Примечание**.** Определение содержания железо(III)-иона в железа(III) аммония сульфате. Около 2,5 г железа(III) аммония сульфата (точная навеска) растворяют в воде в мерной колбе вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. 20,0 мл полученного раствора переносят в колбу с притертой пробкой, прибавляют 10 мл хлористоводородной кислоты 25 % и 2 г калия йодида. Смесь взбалтывают и оставляют в темном месте на 30 мин, затем прибавляют 50 мл воды и титруют натрия тиосульфата раствором 0,1 М (индикатор – крахмал).

1 мл натрия тиосульфата раствора 0,1 М соответствует 0,005585 г железо(III)-иона.

Тяжелые металлы	**ОФС.1.2.2.2.0012.15** **Взамен ГФ X** **Взамен ГФ XI, вып. 1** **Взамен ГФ XII, ч. 1,** **ОФС 42-0059-07**

Описанные ниже методы определения содержания примесей тяжелых металлов (свинец, ртуть, висмут, сурьма, олово, кадмий, серебро, медь, молибден, ванадий, рутений, платина, палладий) в лекарственных средствах основаны на образовании окрашенных сульфидов. Кроме указанных элементов окрашенные сульфиды образуют железо в количестве более 0,05 % и мышьяк.

В качестве источника сульфидов используют раствор натрия сульфида (метод 1) или тиоацетамидный реактив (метод 2).

После проведения реакции интенсивность окраски испытуемого раствора сравнивают с окраской эталонного раствора. Окраска, появившаяся в испытуемом растворе, не должна превышать окраску эталонного раствора.

Определение считается достоверным, если в эталонном растворе наблюдается слабое коричневое окрашивание по сравнению с контрольным раствором.

Определение тяжелых металлов в растворах лекарственных средств возможно для субстанций, образующих прозрачные, бесцветные растворы и не влияющих на взаимодействие ионов металлов с сульфид-ионом

вследствие наличия комплексообразующих свойств. В остальных случаях определение проводят из сульфатной золы или после другого способа минерализации испытуемого лекарственного средства.

Предельно допустимое содержание тяжелых металлов, метод испытания и условия подготовки испытуемого образца должны быть указаны в фармакопейной статье.

Определение тяжелых металлов в растворах лекарственных средств

Испытуемый раствор. 10 мл раствора испытуемого образца, приготовленного, как указано в фармакопейной статье.

Эталонный раствор. К 2 мл стандартного раствора свинец-иона (5 мкг/мл*)* прибавляют 8 мл воды.

Контрольный раствор. 10 мл воды.

Примечание. Если при приготовлении испытуемого раствора используется органический растворитель, то эталонный, контрольный и стандартный раствор свинец-иона готовят с использованием того же растворителя.

Метод 1. К полученным растворам прибавляют по 1 мл уксусной кислоты разведенной 30 %, 2 капли 2 % раствора натрия сульфида, перемешивают и через 1 мин сравнивают окраску растворов.

В сравниваемых растворах допустима слабая опалесценция от выделившейся серы.

Метод 2. К полученным растворам прибавляют по 2 мл ацетатного буферного раствора pH 3,5, перемешивают, прибавляют по 1 мл тиоацетамидного реактива, перемешивают и через 2 мин сравнивают окраску растворов.

Определение тяжелых металлов в зольном остатке органических лекарственных средств

Испытуемый раствор. Зольный остаток, полученный после сжигания 1,0 г (если не указано иначе в фармакопейной статье) испытуемого образца в присутствии серной кислоты концентрированной, обрабатывают при

нагревании на сетке 2 мл насыщенного раствора аммония ацетата, нейтрализованного раствором натрия гидроксида, прибавляют 3 мл воды и фильтруют в пробирку через беззольный фильтр, предварительно промытый 1 % раствором уксусной кислоты, а затем горячей водой. Тигель и фильтр промывают 5 мл воды, пропуская её через тот же фильтр в ту же пробирку.

Эталонный раствор 1. В тигель помещают серную кислоту концентрированную в количестве, взятом для сжигания испытуемого образца, и далее поступают как с испытуемым образцом, но промывание тигля и фильтра производят лишь 3 мл воды, после чего к фильтрату прибавляют 2 мл стандартного раствора свинец-иона (5 мкг/мл).

Эталонный раствор 2. В тигель помещают серную кислоту концентрированную в количестве, взятом для сжигания испытуемого образца, и далее поступают как с испытуемым образцом, но промывание тигля и фильтра производят лишь 3 мл воды, после чего к фильтрату прибавляют 2 мл стандартного раствора свинец-иона (10 мкг/мл).

Контрольный раствор. Готовят так же, как и испытуемый раствор, но без испытуемого образца.

Далее определение проводят любым из описанных выше методов определения тяжелых металлов в растворах лекарственных средств.

Примечание. Определению тяжелых металлов из зольного остатка наличие солей железа в препаратах не мешает.

Стандартные растворы свинец-иона

Стандартный раствор 100 мкг/мл свинец-иона. 0,0799 г свинца нитрата помещают в мерную колбу вместимостью 500 мл и растворяют в 50 мл воды с добавлением 0,5 мл азотной кислоты концентрированной, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Стандартный раствор 10 мкг/мл свинец-иона. 10,0 мл стандартного раствора свинец-иона (100 мкг/мл свинец-иона) помещают в мерную колбу вместимомтью 100 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Срок хранения 1 сут.

Стандартный раствор 5 мкг/мл свинец-иона. 5,0 мл стандартного раствора свинец-иона (100 мкг/мл свинец-иона) помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Срок хранения 1 сут.

Приведенные выше методы не являются селективными и могут быть использованы только для определения предельного суммарного содержания перечисленных тяжелых металлов в лекарственных средствах.

Для количественного определения отдельных ионов следует использовать следующие методы:

- атомно-абсорбционную спектрометрию;
- атомно-эмиссионную спектрометрию с индуктивно связанной плазмой;
- масс-спектрометрию с индуктивно связанной плазмой.

Методики количественного определения тяжелых металлов в лекарственных средствах должны быть валидированы и описаны в фармакопейной статье.

Зола общая **ОФС.1.2.2.2.0013.15**

Взамен ст. ГФ XI, вып. 1

Взамен ГФ XII, ч.1, ОФС 42-0055-07

Требования данной общей фармакопейной статьи распространяются на метод определения золы общей в лекарственных средствах, лекарственном растительном сырье (свежем и высушенном) и лекарственных растительных препаратах.

Определение общей золы проводят с измельченным испытуемым образцом. При необходимости лекарственное средство растирают в ступке перед взятием навески.

Высушенное и свежее лекарственное растительное сырье измельчают с помощью соответствующего оборудования и приспособлений (ножницы, мельницы различных типов, ступки и др.). Высушенное лекарственное растительное сырье измельчают до размера частиц не более 2 мм.

Платиновый, фарфоровый или кварцевый тигель нагревают до красного каления (550 – 650 °С) в течение 30 мин, затем охлаждают в эксикаторе и точно взвешивают. Прокаливание тигля проводят до постоянной массы. Около 1 г (точная навеска) лекарственного средства или 3 – 5 г (точная навеска) высушенного лекарственного растительного сырья, или 5 – 25 г (точная навеска) свежего лекарственного растительного сырья, или 2 – 3 г (точная навеска) лекарственного растительного препарата помещают в подготовленный тигель, равномерно распределяя анализируемую навеску по

дну тигля. Испытуемый образец в тигле осторожно нагревают при 100 – 105 °С в течение 1 ч и далее проводят сжигание с последующим прокаливанием остатка образца при температуре 550 – 650 °С. Испытуемый образец свежего лекарственного растительного сырья осторожно нагревают в тигле, не допуская разбрызгивания пробы. Тигель охлаждают в эксикаторе и взвешивают. Прокаливание повторяют до постоянной массы, избегая сплавления золы и спекания её со стенками тигля. В ходе сжигания не должно появляться пламя. Если после длительного прокаливания зола все ещё содержит черные частицы, её обрабатывают горячей водой, фильтруют через беззольный бумажный фильтр, осадок и фильтр сжигают, объединяют фильтрат с золой, осторожно упаривают досуха и сжигают, после чего тигель с золой охлаждают в эксикаторе и взвешивают. Процедура сжигания повторяется до достижения постоянной массы зольного остатка.

Содержание общей золы (X) в процентах в лекарственном средстве, свежем и высушенном лекарственном растительном сырье, лекарственном растительном препарате вычисляют по формуле:

$$X = \frac{m_1 \cdot 100}{m_2},$$

где m_1 – масса золы, г;

m_2 – масса лекарственного средства или лекарственного растительного сырья/препарата, г.

Сульфатная зола	**ОФС.1.2.2.2.0014.15** **Взамен ГФ X** **Взамен ст. ГФ XI, вып. 1** **Взамен ГФ XII, ч.1, ОФС 42-0056-07**

Фарфоровый, кварцевый или платиновый тигель прокаливают при температуре 550 – 650 ºС в течение 30 мин, охлаждают в эксикаторе над силикагелем или другим подходящим осушителем и точно взвешивают по окончании каждого прокаливания.

Точную навеску испытуемого вещества (обычно 1 – 2 г) помещают в предварительно прокаленный тигель, смачивают 1 мл серной кислоты концентрированной и осторожно (избегая сильного вспенивания вещества) нагревают на пламени, песчаной бане или электрической плитке с закрытым нагревательным элементом и терморегулятором до обугливания. После охлаждения смачивают остаток 1 мл серной кислоты концентрированной и осторожно нагревают до удаления паров серной кислоты. Затем тигель помещают в муфельную печь и прокаливают при температуре 550 – 650 ºС до тех пор, пока остаток полностью не превратится в пепел. При этом следует избегать появления пламени, сплавления золы и спекания ее со стенками тигля. По окончании прокаливания тигель охлаждают в эксикаторе, взвешивают и рассчитывают процентное содержание остатка.

В случае получения результата, превышающего допустимый предел, указанный в фармакопейной статье, остаток вновь смачивают серной кислотой концентрированной, сжигают в течение 30 мин, прокаливают до постоянной массы или до тех пор, пока два последовательных результата

взвешивания не будут отличаться не более чем на 0,5 мг, или содержание остатка не будет удовлетворять указанному пределу.

Количество испытуемого вещества выбирается таким образом, чтобы при указанном пределе масса остатка (обычно около 1 мг) могла быть измерена с удовлетворительной точностью.

Определение фтора	**ОФС.1.2.3.0001.15** **Вводится впервые**

Содержание фтора в лекарственных средствах может быть определено одним из трех методов: титриметрическим, спектрофотометрическим или ионометрическим.

1. Титриметрический метод

Точную навеску лекарственного средства, указанную в фармакопейной статье, сжигают в колбе с кислородом, поглощая продукты сжигания 15 мл воды. Пробку, держатель образца и стенки колбы промывают 40 мл воды и в колбу вносят 0,6 мл ализарина S раствора 0,1 %. Прибавляют по каплям натрия гидроксида раствор 0,1 М до красно-малинового окрашивания, затем 2 – 3 капли азотной кислоты раствора 1,5 % до перехода в желтое окрашивание, 3,5 мл буферного раствора, pH 3,0 и титруют тория(IV) нитрата раствором 0,005 М до розовой окраски.

1 мл тория(IV) нитрата раствора 0,005 М соответствует 0,380 мг фтора.

Примечания.

1. Приготовление буферного раствора pH 3,0. Растворяют 2,0 г хлоруксусной кислоты в 20 мл воды и нейтрализуют натрия гидроксида раствором 1 М до слабо-розовой окраски по фенолфталеину. Затем прибавляют 2,0 г хлоруксусной кислоты и доводят объем раствора водой до 100 мл.

2. Приготовление тория(IV) нитрата раствора 0,005 М. 2,761 г тория(IV) нитрата [$Th(NO_3)_4 \cdot 4H_2O$] растворяют в воде в мерной колбе вместимостью 1 л, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Установка титра. Около 0,05 г (точная навеска) натрия фторида, предварительно высушенного при 150 ºС до постоянной массы, вносят в мерную колбу вместимостью 250 мл, растворяют в воде, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. К 20,0 мл полученного раствора

прибавляют 0,6 мл ализарина S раствора 0,1 % и затем по каплям натрия гидроксида раствор 0,1 М до перехода розовой окраски в желтую. Прибавляют 5 мл буферного раствора pH 3,0 и титруют раствором тория(IV) нитрата до перехода желтой окраски в розовую.

1 мл тория(IV) нитрата раствора 0,005 М соответствует 0,380 мг фтора.

2. Спектрофотометрический метод

Точную навеску лекарственного средства, указанную в фармакопейной статье, сжигают, как описано выше, раствор количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют по 25 мл арсеназо I раствора 0,01 % и 0,005 М раствора тория(IV) нитрата, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Через 30 мин измеряют оптическую плотность полученного раствора в максимуме поглощения при длине волны 580 нм относительно раствора сравнения, содержащего те же количества реактивов, но без лекарственного средства. Содержание фтора определяют по калибровочному графику.

Построение калибровочного графика. В мерные колбы вместимостью 100 мл вносят 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; и 8,0 мл стандартного раствора фтора и далее поступают, как указано выше, начиная со слов «...прибавляют по 25 мл». Строят калибровочный график, откладывая по оси абсцисс количество микрограммов фтора, а по оси ординат – средние значения оптической плотности.

Примечания.

1. Приготовление арсеназо I раствора 0,01 %. 0,01 г арсеназо I растворяют в воде, доводят объем раствора водой до 100 мл и перемешивают.

2. Приготовление стандартного раствора фтора. Около 0,0552 г (точная навеска) натрия фторида растворяют в воде в мерной колбе вместимостью 250 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. 5,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

1 мл полученного раствора содержит 10 мкг фтора.

3. Ионометрический метод

Точную навеску лекарственного средства, указанную в фармакопейной статье, сжигают, как описано выше, раствор количественно переносят в полиэтиленовый стакан вместимостью 150 мл, промывая держатель образца и стенки колбы 50 мл воды, и перемешивают в течение 5 мин с помощью магнитной мешалки. Полученный раствор количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят водой до метки и перемешивают.

К объему полученного раствора, указанному в фармакопейной статье, прибавляют равный объем буферного раствора (pH 5,0 – 5,5) и перемешивают, как указано выше.

Определение содержания фторид-ионов проводят с использованием градуировочного графика или методом стандартных добавок, как описано в ОФС «Ионометрия». В качестве измерительного электрода используют фторидселективный электрод, в качестве электрода сравнения – хлорсеребряный или каломельный электроды.

Стандартные растворы фторид-иона необходимых концентраций (pF = 2, pF = 3 и т.д.) готовят путем разбавления основного стандартного раствора фторид-иона 1900 мкг/мл (pF = 1).

Примечания.

1. Приготовление буферного раствора (pH 5,0 – 5,5). 58,0 г натрия хлорида и 4,0 г натрия эдетата помещают в мерную колбу вместимостью 1 л, растворяют в воде, прибавляют 57,0 мл уксусной кислоты ледяной, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. С помощью натрия гидроксида раствора 1 М или хлористоводородной кислоты раствора 1 М доводят pH полученного раствора до значения 5,0 – 5,5.

Указанные количества компонентов могут быть изменены в зависимости от испытания и состава испытуемого образца.

2. Приготовление основного стандартного раствора фторид-иона 1900 мкг/мл (pF = 1). 4,199 г натрия фторида помещают в мерную колбу вместимостью 1 л, растворяют в воде, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Раствор хранят в полиэтиленовой или полипропиленовой емкости при комнатной температуре.

Срок годности – не более 3 мес.

Определение воды	**ОФС.1.2.3.0002.15** **Взамен ст. ГФ X** **Взамен ст. ГФ XI, вып. 1**

1. Метод К. Фишера (полумикрометод)

Метод основан на химическом взаимодействии воды с компонентами реактива К. Фишера.

Реактив К. Фишера. Реактив К. Фишера представляет собой раствор серы диоксида, йода и пиридина (или другого основания, например, имидазола) в метаноле. Взаимодействие реактива с водой протекает в две стадии стехиометрически по уравнениям:

$$H_2O + SO_2 + I_2 + 3C_5H_5N \rightarrow 2C_5H_5N \cdot HI + C_5H_5NSO_3$$

$$C_5H_5NSO_3 + CH_3OH \rightarrow C_5H_5N \cdot HSO_4CH_3$$

Используемые растворы и реактивы должны быть безводными. Их хранят и применяют в условиях, исключающих возможность воздействия на них атмосферной влаги.

Йодсернистый реактив представляет собой раствор, содержащий пиридин безводный, монометиловый эфир этиленгликоля, йод и серу диоксид. В йодсернистых реактивах часто пиридин заменяют на другие основания. Использование реактивов такого состава должно быть предварительно валидировано для подтверждения в каждом конкретном случае стехиометрии реакции и отсутствия несовместимости между испытуемым веществом и реактивом.

При определении воды в твердых веществах, нерастворимых в метаноле, тонко измельченную навеску вещества взбалтывают с метанолом, после чего титруют реактивом К. Фишера. Некоторые вещества или смеси можно растворять в безводной уксусной кислоте, хлороформе, пиридине и других растворителях.

Пропанол и другие алканолы имеют большую растворяющую способность для молекул с длинной цепью и могут использоваться как таковые или в смеси с метанолом при анализе высокомолекулярных соединений.

2-Метоксиэтанол (монометиловый эфир этиленгликоля) применяют в тех случаях, когда в присутствии метанола протекают побочные реакции (этерификация, образование кеталей и т. п.). Однако, титрование в этом растворителе протекает медленнее по сравнению с метанолом. Хлороформ является хорошим растворителем для жиров и может использоваться в смеси с метанолом, содержание которого обычно составляет 50 %, но не менее 25 %. Формамид улучшает растворимость полярных веществ и может добавляться в метанол для определения воды в протеинах. Не рекомендуется использование в качестве рабочей среды чистые апротонные растворители, которые нарушают стехиометрию реакции К. Фишера.

Масса навески, время взбалтывания навески с растворителем, а также наименование растворителя, должны быть указаны в фармакопейной статье.

С помощью реактива К. Фишера может быть определена как гигроскопическая, так и кристаллизационная вода. При этом воду можно определять в органических и неорганических соединениях, в различных растворителях и летучих веществах.

Прибор. Прибор для титрования по методу К. Фишера представляет собой закрытую систему, состоящую из бюретки, снабженной осушительной трубкой, заполненной, осушающим агентом, (например, молекулярными ситами), сосуда для подачи реактива и колбы для титрования, соединенных с бюреткой. Колба для титрования представляет собой сосуд вместимостью

60–100 мл с двумя платиновыми электродами, трубкой для подвода азота, осушительной трубкой, заполненной, осушающим агентом, (например, молекулярными ситами), и пробкой, в которую вставляется кончик бюретки. Испытуемое вещество вносят в сосуд через трубку, расположенную с противоположной стороны по отношению к трубке-осушителю, и закрываемую притертой пробкой. Перемешивание раствора в процессе титрования осуществляют при помощи магнитной мешалки или продуванием высушенного азота через раствор.

Конечную точку титрования определяют амперометрически. Электрическая схема состоит из потенциометра с сопротивлением 2000 Ом, подключенного к источнику постоянного тока с напряжением 1,5 В и обеспечивающего необходимую разность потенциалов. Разность потенциалов отрегулирована таким образом, чтобы через платиновые электроды, соединенные последовательно с микроамперметром, проходил небольшой начальный ток. При прибавлении реактива стрелка микроамперметра отклоняется, но сразу же возвращается в исходное положение. В конце реакции получаемое отклонение должно оставаться неизменным не менее 30 с.

Конечную точку титрования допускается определять визуально по изменению окраски титруемой жидкости от желтой до красновато-коричневой при условии обеспечения необходимой точности. При этом необходимо проводить контрольный опыт.

Допускается использование автоматических титраторов в соответствии с инструкцией производителя.

Если нет других указаний в фармакопейной статье, используют методику А.

Методика А. Точную навеску испытуемого вещества, содержащую приблизительно от 30 до 50 мг воды, помещают в сосуд для титрования, в который предварительно внесено 5,0 мл метанола безводного. Перемешивают

1 мин и титруют реактивом К. Фишера, прибавляя его при приближении к конечной точке по 0,1–0,05 мл.

Параллельно проводят контрольный опыт (титруют 5,0 мл метанола безводного).

Методика Б. Около 20 мл метанола безводного или растворителя, указанного в фармакопейной статье, помещают в сосуд для титрования и титруют реактивом К. Фишера, определяя конечную точку титрования амперометрически. Затем в сосуд для титрования вносят точную навеску испытуемого вещества, указанную в фармакопейной статье. Смесь перемешивают в течение 1 мин и снова титруют реактивом К. Фишера, определяя конечную точку титрования амперометрически.

Методика В. Около 10 мл метанола безводного или растворителя, указанного в фармакопейной статье, помещают в сосуд для титрования и титруют йодсернистым реактивом, определяя конечную точку титрования амперометрически.

Затем быстро вносят в сосуд для титрования указанное количество испытуемого вещества и точно отмеренный объем йодсернистого реактива, взятый с избытком приблизительно на 1 мл или объем, указанный в фармакопейной статье. Сосуд закрывают пробкой, выдерживают в защищенном от света месте в течение 1 мин или в течение времени, указанного в фармакопейной статье, периодически перемешивая содержимое сосуда. Избыток йодсернистого реактива титруют до первоначального значения силы тока, используя метанол безводный или растворитель, указанный в фармакопейной статье, к которому было прибавлено точно известное количество воды, эквивалентное около 2,5 мг/мл.

2. Микрометод определения воды (кулонометрический)

При кулонометрическом титровании необходимый для реакции К. Фишера йод образуется при анодном окислении йодид-иона:

$$2J^- - 2e \rightarrow J_2$$

Образующийся йод реагирует с присутствующей водой и диоксидом серы в присутствии основания. Йод потребляется до тех пор, пока в среде присутствует вода. Избыток йода указывает на достижение конечной точки титрования. Количество оттитрованной воды пропорционально количеству электричества, пропущенному через ячейку.

1 моль йода соответствует 1 молю воды, а количество электричества 10,71 Кл соответствует 1 мг воды.

Вследствие малого тока титрования кулонометрическое определение применяется для количественного определения микроколичеств воды: от 10 мкг до 10 мг.

Правильность и точность метода должны быть обеспечены устранением атмосферной влаги из системы.

Оборудование

Главным блоком прибора является кулонометрическая ячейка. Наиболее часто используемая ячейка состоит из анодного отделения, в котором протекает реакция К. Фишера, и меньшего по объему катодного отделения, в котором протекает катодная реакция восстановления. Каждое отделение содержит платиновый электрод. Анодное отделение заполняется анолитом, в качестве которого используется модифицированный реактив К. Фишера, содержащий йодид-анион вместо йода. Катодное отделение заполняется подходящим католитом, как правило, содержащим соли аммония в качестве активного компонента. Отделения разделены диафрагмой, предотвращающей смешение двух растворов. Поскольку диффузия активных компонентов не может быть полностью исключена диафрагмой, компоненты католита должны быть совместимы с анолитом. Могут использоваться и однокамерные ячейки без диафрагмы. В этом случае анодная и катодная реакции протекают в одном и том же объеме электролита, поэтому катодная реакция восстановления не должна давать продукты, способные окисляться на аноде, что может привести к завышенным результатам определения.

Реакционная ячейка должна поддерживаться в абсолютно сухом состоянии. Заливка реактива в анодное отделение производится через сухую воронку, после чего ячейка немедленно герметизируется. При этом может произойти обесцвечивание реактива. Влагу удаляют из системы предварительным электролизом.

Катодное отделение также должно быть безводным. Небольшой избыток элементарного йода в католите не оказывает влияния на титрование.

Анализируемая жидкая проба вводится в ячейку с анолитом шприцем через силиконовую прокладку. Следует избегать ввода твердых проб в ячейку. Тем не менее, если необходимо провести испытание на твердых образцах, они вводятся через герметично закрываемый ввод; при этом должны быть предприняты меры по предотвращению поступления в ячейку атмосферной влаги, например, работать в перчаточном боксе в атмосфере сухого инертного газа. Также твердые пробы могут вводиться в виде раствора после растворения в подходящем растворителе, или вода высвобождается из пробы в трубчатой печи при нагревании и переносится в анолит потоком сухого инертного газа. Газы вводятся в анолит через трубку для ввода газа (барботер).

Объем пробы не должен превышать 10 мл. Обычно в ячейку дозируется 0,5–5,0 мл жидкой пробы. Газовые пробы вводятся в объеме от 100 мл до 10 л.

Методика

Кулонометрическое титрование выполняют до установления конечной точки титрования.

Отделение реакционной ячейки заполняют электролитом для микроопределения воды согласно инструкциям изготовителя. Влагу удаляют из системы предварительным электролизом.

Точное количество испытуемого вещества, указанное в фармакопейной статье, вносят в реакционную ячейку и перемешивают в течение 30 с или в течение времени, указанного в фармакопейной статье. Титруют до установления конечной точки титрования.

При использовании испарителя точную навеску испытуемого вещества, указанную в фармакопейной статье, помещают в трубку и нагревают. После выпаривания воды из образца в ячейку проводят титрование.

Проводят контрольный опыт и вычисляют содержание воды в испытуемом веществе в процентах.

Проверка точности. Между двумя последовательными титрованиями вводят точно взвешенное количество воды – такое же, как в определяемом образце, и выполняют кулонометрическое титрование. Результат должен быть в пределах от 97,5 до 102,5 % для содержания 1000 мкг воды в образце и в пределах от 90,0 до 110,0 % для содержания 100 мкг воды в образце.

3. Определение воды методом дистилляции

Прибор. Определение проводят в приборе (рис. 1), состоящем из стеклянной круглодонной колбы (1) вместимостью от 250 до 500 мл, приемника (2), представляющего собой градуированную пробирку или бюретку вместимостью 6–10 мл с ценой деления 0,1 мл, и холодильника (3).

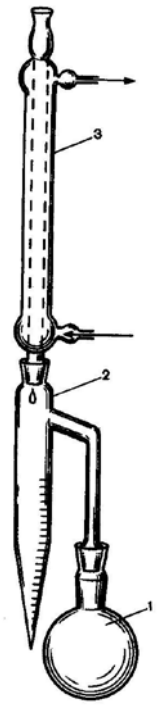


Рис. 1. Прибор для определения воды методом дистилляции
1 – колба, 2 – приемник, 3 – холодильник

Методика

В колбу (1) отвешивают с точностью до 1 % указанное в фармакопейной статье количество испытуемого вещества (от 10,0 до 20,0 г (точная навеска), содержащее от 2 до 3 мл воды), прибавляют 100 мл толуола или ксилола и несколько кусочков пористого материала (например, несколько кусочков пемзы). Колбу нагревают на электроплитке или песчаной бане до кипения. Кипячение ведут так, чтобы конденсирующийся растворитель не скапливался в холодильнике, а спокойно стекал навстречу поднимающимся парам жидкости со скоростью от 2 до 4 капель в секунду. Кипячение прекращают, когда объем воды в приемнике перестанет увеличиваться и верхний слой растворителя в приемнике станет прозрачным. Внутреннюю трубку холодильника промывают толуолом и продолжают нагревание еще 5 мин, после чего приемник охлаждают до комнатной температуры и стряхивают со стенок приемника все капли воды.

Вся отогнанная вода собирается в нижней части приемника. После полного разделения слоев отмечают объем отогнанной воды.

Анизидиновое число	**ОФС.1.2.3.0003.15** **Вводится впервые**

Анизидиновым числом ($I_{АН}$) называется число, определяющее содержание в испытуемом веществе (масло, твердые жиры, липиды) вторичных продуктов окисления (альдегидов, кетонов), равное увеличенной в 100 раз оптической плотности, измеренной в кювете с толщиной слоя 1 см раствора, содержащего 1 г испытуемого вещества в 100 мл смеси растворителей после реакции с *п*-анизидином в условиях данной методики.

Операции с растворами проводят быстро, избегая воздействия яркого света.

Испытуемый раствор А. Если не указано иначе в фармакопейной статье, навеску 0,500 г испытуемого вещества помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в триметилпентане, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают.

Испытуемый раствор Б. К 5,0 мл испытуемого раствора А прибавляют 1,0 мл *п*-анизидина раствора 0,25 % в уксусной кислоте ледяной и встряхивают.

Раствор сравнения. К 5,0 мл триметилпентана прибавляют 1,0 мл *п*-анизидина раствора 0,25 % в уксусной кислоте ледяной и встряхивают.

Методика

Измеряют оптическую плотность испытуемого раствора А в максимуме поглощения при длине волны 350 нм относительно триметилпентана. Измеряют оптическую плотность испытуемого раствора Б

в максимуме поглощения при длине волны 350 нм ровно через 10 мин после его приготовления относительно раствора сравнения.

Анизидиновое число ($I_{\text{АН}}$) вычисляют по формуле:

$$I_{AH} = \frac{25 \cdot (1{,}2 \cdot A_1 - A_2)}{a},$$

где A_1 – оптическая плотность испытуемого раствора Б;

A_2 – оптическая плотность испытуемого раствора А;

a – навеска испытуемого вещества в испытуемом растворе А, г;

1,2 – коэффициент, учитывающий объём испытуемых растворов.

Примечание. Раствор *п*-анизидина используют свежеприготовленным.

Кислотное число **ОФС.1.2.3.0004.15**

Взамен ГФ X

Взамен ст. ГФ XI, вып.1

Кислотным числом (I_A) называют количество калия гидроксида, выраженное в миллиграммах, необходимое для нейтрализации свободных кислот, содержащихся в 1 г испытуемого вещества.

Методика

Точную навеску испытуемого вещества, в зависимости от ожидаемого кислотного числа (таблица), помещают в колбу с обратным холодильником вместимостью 250 мл и растворяют, если не указано иначе в фармакопейной статье, в 50 мл смеси равных объемов спирта 96 % и эфира, предварительно нейтрализованных 0,1 М раствором натрия гидроксида в присутствии 0,5 мл фенолфталеина раствора 1 %.

Таблица – Навеска испытуемого вещества в зависимости от ожидаемого кислотного числа

Ожидаемое кислотное число	Навеска испытуемого вещества, г
Менее 1	20
1 – 4	10
4 – 10	4
10 – 25	1,5
25 – 50	1
Более 50	0,5

При необходимости нагревают на водяной бане до полного растворения испытуемого вещества.

Прибавляют 1 мл фенолфталеина раствора 1 % и титруют натрия гидроксида раствором 0,1 М до появления бледно-розового окрашивания, не исчезающего в течение 30 с.

Кислотное число вычисляют по формуле:

$$I_{\text{A}} = \frac{V \cdot 5{,}610}{a} \ ,$$

где V – объем натрия гидроксида раствора 0,1 М, израсходованный на титрование, мл;

a – навеска испытуемого вещества, г;

5,610 – количество калия гидроксида, соответствующее 1 мл натрия гидроксида раствора 0,1 М, мг.

При анализе окрашенных масел конечную точку титрования устанавливают потенциометрически.

Йодное число **ОФС.1.2.3.0005.15**

Взамен ГФ X

Взамен ст. ГФ XI, вып.1

Йодным числом (I_I) называют количество йода, выраженное в граммах, связываемое 100 г испытуемого вещества. Йодное число характеризует содержание в испытуемом веществе непредельных соединений (например, непредельных жирных кислот в жирах или маслах).

Метод 1

Точную навеску испытуемого вещества в количестве, указанном в табл. 1, помещают в сухую коническую колбу с притертой пробкой вместимостью 250 мл, растворяют в 3 мл эфира или хлороформа, прибавляют 20,0 мл йода монохлорида раствора 0,1 М, закрывают колбу пробкой, смоченной 10 % раствором калия йодида, осторожно встряхивают и выдерживают в темном месте в течение 1 ч.

Прибавляют последовательно 10,0 мл калия йодида раствора 10 %, 50 мл воды и титруют натрия тиосульфата раствором 0,1 М при постоянном энергичном встряхивании до светло-желтой окраски раствора. Прибавляют 3 мл хлороформа, сильно встряхивают, затем прибавляют 1 мл раствора крахмала и продолжают титрование до обесцвечивания раствора. Проводят контрольный опыт в тех же условиях.

При анализе твердых жиров навеску испытуемого вещества растворяют в 6 мл эфира, прибавляют 20,0 мл йода монохлорида раствора 0,1 М и 25 мл воды. Дальнейшее определение проводят, как указано выше.

Таблица 1 – Величина навески испытуемого вещества в зависимости от ожидаемого йодного числа

Ожидаемое йодное число	**Навеска испытуемого вещества, г**
Менее 30	1,1 – 0,7
31 – 50	0,7 – 0,5
51 – 100	0,5 – 0,25
101 – 150	0,25 – 0,15
Более 150	Менее 0,15

Йодное число вычисляют по формуле:

$$I_{\text{I}} = \frac{0{,}01269 \cdot (V_2 - V_1) \cdot 100}{a},$$

где V_1 – объем натрия тиосульфата раствора 0,1 М, израсходованный на титрование в основном опыте, мл;

V_2 – объем натрия тиосульфата раствора 0,1 М, израсходованный в контрольном опыте, мл;

a – навеска испытуемого вещества, г;

0,01269 – титр натрия тиосульфата раствора 0,1 М по йоду, г/мл.

Метод 2

Точную навеску испытуемого вещества в количестве, указанном в табл. 2, помещают в сухую коническую колбу с притертой пробкой вместимостью 250 мл и растворяют в 15 мл хлороформа. Медленно прибавляют 25,0 мл раствора йода бромида. Колбу закрывают и выдерживают в темном месте в течение 30 мин, если не указано иначе в фармакопейной статье, часто встряхивая. Прибавляют последовательно 10,0 мл калия йодида раствора 10 %, 100 мл воды и титруют натрия тиосульфата раствором 0,1 М при постоянном энергичном встряхивании до светло-желтой окраски раствора.

Прибавляют 5 мл раствора крахмала и продолжают титрование, прибавляя натрия тиосульфата раствор 0,1 М по каплям, до обесцвечивания раствора. Проводят контрольный опыт в тех же условиях.

Таблица 2 – Величина навески испытуемого вещества в зависимости от ожидаемого йодного числа

Ожидаемое йодное число	**Навеска испытуемого вещества, г**
Менее 20	1,0
20 – 60	0,5–0,25
60 – 100	0,25–0,15
Более 100	0,15–0,10

Йодное число вычисляют по формуле, приведенной в методе 1.

Гидроксильное число	**ОФС.1.2.3.0006.15** **Вводится впервые**

Гидроксильным числом (I_{OH}) называют количество калия гидроксида, выраженное в миллиграммах, эквивалентное суммарному количеству кислоты, присутствующей в растворе после ацилирования 1 г испытуемого вещества.

Гидроксильное число характеризует число гидроксильных групп в веществе.

Гидроксильное число может быть определено одним из трех методов.

Метод 1

Если не указано иначе в фармакопейной статье, точную навеску испытуемого вещества, указанную в табл. 1, помещают в колбу вместимостью 150 мл, снабженную обратным холодильником. Прибавляют 25 % раствор уксусного ангидрида в безводном пиридине в количестве, указанном в табл. 1. Нагревают колбу на водяной бане в течение 1 ч, поддерживая уровень воды в бане на 2,5 см выше уровня жидкости в колбе. Вынимают колбу из бани и оставляют охлаждаться. Прибавляют 5 мл воды через верхний конец холодильника. При появлении помутнения прибавляют пиридин до образования прозрачного раствора, отмечая прибавленный объем. Колбу встряхивают и снова помещают на водяную баню на 10 мин. Вынимают колбу из бани и оставляют охлаждаться. Промывают холодильник и стенки колбы 5 мл спирта 96 %, предварительно нейтрализованного по

фенолфталеину. Содержимое колбы титруют калия гидроксида раствором спиртовым 0,5 М, используя 0,2 мл фенолфталеина раствора 1 % в качестве индикатора. Проводят контрольный опыт в тех же условиях.

Таблица 1 – Навеска испытуемого вещества и объем ацилирующего агента в зависимости от ожидаемого гидроксильного числа

Ожидаемое гидроксильное число	**Навеска испытуемого вещества, г**	**Объем ацилирующего агента, мл**
10 – 100	2,0	5,0
100 – 150	1,5	5,0
150 – 200	1,0	5,0
200 – 250	0,75	5,0
250 – 300	0,60 или 1,20	5,0 или 10,0
300 – 350	1,0	10,0
350 – 700	0,75	15,0
700 – 950	0,5	15,0

Гидроксильное число вычисляют по формуле:

$$I_{OH} = \frac{28{,}05 \cdot (V_2 - V_1) + I_A}{a}, \qquad (1)$$

где V_1 – объем калия гидроксида раствора спиртового 0,5 М, израсходованный на титрование в основном опыте, мл;

V_2 – объем калия гидроксида раствора спиртового 0,5 М, израсходованный в контрольном опыте, мл;

I_A – кислотное число;

a – навеска испытуемого вещества, г;

28,05 – количество калия гидроксида, содержащееся в 1 мл калия гидроксида раствора спиртового 0,5 М, мг.

Метод 2

Точную навеску испытуемого вещества, указанную в фармакопейной статье, помещают в сухую коническую колбу вместимостью 5 мл с притертой пробкой и прибавляют 2,0 мл пропионового ангидрида реактива. Колбу закрывают, встряхивают до полного растворения испытуемого вещества и оставляют на 2 ч. Затем содержимое колбы переносят в коническую колбу вместимостью 500 мл, содержащую 25,0 мл анилина

раствора 0,9 % в циклогексане и 30 мл уксусной кислоты ледяной. Содержимое колбы перемешивают круговым движением и оставляют на 5 мин. Прибавляют 0,05 мл кристаллического фиолетового раствора 0,5 % и титруют хлорной кислоты раствором 0,1 М до появления изумрудно-зеленой окраски. Проводят контрольный опыт в тех же условиях.

Гидроксильное число вычисляют по формуле:

$$I_{OH} = \frac{5{,}610 \cdot (V_2 - V_1)}{a}, \qquad (2)$$

где V_1 – объем хлорной кислоты раствора 0,1 М, израсходованный на титрование в основном опыте, мл;

V_2 – объем хлорной кислоты раствора 0,1 М, израсходованный в контрольном опыте, мл;

a – навеска испытуемого вещества, г;

5,610 – количество калия гидроксида, соответствующее 1 мл хлорной кислоты раствора 0,1 М, мг.

Полученное значение гидроксильного числа пересчитывают с поправкой на содержание воды по формуле:

$$I'_{OH} = I_{OH} - 31{,}1 \cdot W, \quad (3)$$

где W – содержание воды в испытуемом веществе, %.

Метод 3

Точную навеску испытуемого вещества, указанную в табл.2, помещают в коническую колбу вместимостью 250 мл с притертой пробкой и прибавляют 5 мл смеси свежеперегнанных пиридина и уксусного ангидрида (3:1). Присоединяют обратный холодильник и нагревают колбу на кипящей водяной бане в течение 1 ч, прибавляют 10 мл воды через холодильник и нагревают еще 10 мин. Охлаждают и прибавляют 25 мл бутанола, предварительно нейтрализованного по фенолфталеину калия гидроксида спиртовым раствором 0,5 М – сначала через холодильник прибавляют 15 мл, затем холодильник удаляют и промывают стенки колбы 10 мл бутанола.

Прибавляют 1 мл фенолфталеина раствора 1 % и титруют калия гидроксида раствором спиртовым 0,5 М. Проводят контрольный опыт в тех же условиях.

Определение свободных кислот. Около 10,0 г (точная навеска) испытуемого вещества помещают в коническую колбу вместимостью 125 мл, прибавляют 10 мл свежеперегнанного пиридина, предварительно нейтрализованного по фенолфталеину, прибавляют 1 мл фенолфталеина раствора 1 % и титруют калия гидроксида раствором спиртовым 0,5 М.

Гидроксильное число (I_{OH}) вычисляют по формуле:

$$I_{OH} = \frac{28{,}05}{a_1} \cdot \left[V_1 + \frac{a_1 \cdot V_2}{a_2} - V\right], \quad (4)$$

где a_1 и a_2 – навески вещества, взятые для ацилирования и для определения свободных кислот соответственно, г;

V – объем калия гидроксида раствора спиртового 0,5 М, израсходованный на титрование в основном опыте после ацилирования, мл;

V_1 – объем калия гидроксида спиртового раствора 0,5 М, израсходованный на титрование в контрольном опыте при ацилировании, мл;

V_2 – объем калия гидроксида раствора спиртового 0,5 М, израсходованный при титровании свободных кислот, мл;

28,05 – количество калия гидроксида, содержащееся в 1 мл калия гидроксида раствора спиртового 0,5 М, мг.

Таблица 2 – Навеска испытуемого вещества в зависимости от ожидаемого гидроксильного числа

Ожидаемое гидроксильное число	**Навеска испытуемого вещества, г**
Менее 20	10
20 – 50	5
50 – 100	3
100 – 150	2
150 – 200	1,5
200 – 250	1,25
250 – 300	1,0
300 – 350	0,75

При анализе окрашенных масел конечную точку титрования устанавливают потенциометрически.

Перекисное число	**ОФС.1.2.3.0007.15** **Вводится впервые**

Перекисным числом ($I_р$) называют количество перекисей, выраженное в миллиэквивалентах активного кислорода, содержащееся в 1000 г лекарственного средства. Перекисное число может быть определено одним из двух методов.

Испытания проводят, защищая растворы от воздействия ультрафиолетового света.

Метод 1

Около 5,0 г (точная навеска) лекарственного средства помещают в коническую колбу с притертой пробкой вместимостью 250 мл. Прибавляют 30 мл смеси уксусной кислоты ледяной и хлороформа (3:2), встряхивают до растворения лекарственного средства, прибавляют 0,5 мл насыщенного раствора калия йодида и закрывают колбу пробкой. Встряхивают точно в течение 1 мин, прибавляют 30 мл воды и титруют натрия тиосульфата раствором 0,01 М, прибавляя титрант медленно при постоянном энергичном встряхивании до светло-желтой окраски раствора. Затем прибавляют 5 мл раствора крахмала и продолжают титрование при постоянном встряхивании до обесцвечивания раствора. Проводят контрольный опыт в тех же условиях. Если количество титранта в контрольном опыте превышает 0,1 мл, определение проводят со свежеприготовленным насыщенным раствором калия йодида.

Перекисное число ($I_р$) вычисляют по формуле:

$$I_{\text{р}} = \frac{10 \cdot (V - V_0) \cdot c}{a} ,$$

где V – объем натрия тиосульфата раствора 0,01 М, израсходованный на титрование в основном опыте, мл;

V_0 – объем натрия тиосульфата раствора 0,01 М, израсходованный в контрольном опыте, мл;

a – навеска лекарственного средства, г;

c – молярная концентрация раствора натрия тиосульфата.

Примечание**.** Приготовление раствора крахмала. 1,0 г растворимого крахмала растирают с 5 мл воды и выливают смесь в 100 мл кипящей воды, содержащей 10 мг ртути(II) йодида.

Метод 2

Точную навеску лекарственного средства, в зависимости от ожидаемого перекисного числа (таблица), помещают в коническую колбу с притертой пробкой вместимостью 250 мл. Прибавляют 50 мл смеси уксусной кислоты ледяной и триметилпентана (3:2), встряхивают до растворения лекарственного средства, прибавляют 0,5 мл насыщенного раствора калия йодида и закрывают колбу пробкой. Встряхивают точно в течение 1 мин, затем прибавляют 30 мл воды и титруют натрия тиосульфата раствором 0,01 М, прибавляя титрант медленно при постоянном энергичном встряхивании, до светло-желтой окраски раствора. Затем прибавляют около 0,5 мл крахмала раствора 0,5 % и продолжают титрование при постоянном встряхивании до обесцвечивания раствора.

Таблица – Навеска лекарственного средства в зависимости от ожидаемого перекисного числа

Ожидаемое перекисное число	**Навеска лекарственного средства, г**
Менее 12	5,00 – 2,00
12 – 20	2,0 – 1,20
20 – 30	1,20 – 0,80
30 – 50	0,800 – 0,500
50 – 90	0,500 – 0,300

При значениях перекисного числа 70 и выше после прибавления каждой порции титранта раствор выдерживают в течение 15 – 30 с при перемешивании или прибавляют небольшое количество (0,5 – 1,0 % (м/м)) эмульгатора (например, полисорбата 60).

При значениях перекисного числа выше 150 рекомендуется использовать натрия тиосульфата раствор 0,1 М. Проводят контрольный опыт в тех же условиях. Если количество титранта в контрольном опыте превышает 0,1 мл, определение проводят со свежеприготовленным насыщенным раствором калия йодида.

Перекисное число вычисляют по формуле, приведенной в методе 1.

Число омыления **ОФС.1.2.3.0008.15**

Взамен ГФ X

Взамен ст. ГФ XI, вып.1

Числом омыления (I_s) называют количество калия гидроксида выраженное в миллиграммах, необходимое для нейтрализации свободных кислот и омыления сложных эфиров, содержащихся в 1,0 г испытуемого вещества.

Методика

Точную навеску испытуемого вещества в зависимости от ожидаемого числа омыления (таблица) помещают в колбу с обратным холодильником вместимостью 250 мл. Прибавляют 25,0 мл калия гидроксида раствора спиртового 0,5 М и несколько стеклянных бусин, нагревают при кипении на водяной бане в течение 30 мин или времени, указанного в фармакопейной статье, до получения прозрачного раствора. Прибавляют 1 мл фенолфталеина раствора 1 % и немедленно, пока раствор горячий, оттитровывают избыток калия гидроксида хлористоводородной кислоты раствором 0,5 М.

Проводят контрольный опыт в тех же условиях.

Таблица – Навеска испытуемого вещества в зависимости от ожидаемого числа омыления

Ожидаемое число омыления	**Навеска испытуемого вещества, г**
Менее 3	20
3 – 10	12 – 15
10 – 40	8 – 12
40 – 60	5 – 8
60 – 100	3 – 5
100 – 200	2,5 – 3
200 – 300	1 – 2
300 – 400	0,5 – 1

Число омыления (I_s) вычисляют по формуле:

$$I_s = \frac{28{,}05 \cdot (V_2 - V_1)}{a},$$

где V_1 – объем хлористоводородной кислоты раствора 0,5 М, израсходованный на титрование в основном опыте, мл;

V_2 – объем хлористоводородной кислоты раствора 0,5 М, израсходованный в контрольном опыте, мл;

a – навеска испытуемого вещества, г;

28,05 – количество калия гидроксида, содержащееся в 1 мл калия гидроксида раствора спиртового 0,5 М, мг.

В случае трудно омыляемых веществ прибавляют 5 – 10 мл ксилола и нагревают более продолжительное время (время нагревания указывают в фармакопейной статье).

При анализе окрашенных масел конечную точку титрования устанавливают потенциометрически.

Эфирное число	**ОФС.1.2.3.0009.15** **Взамен ГФ X** **Взамен ст. ГФ XI, вып.1**

Эфирным числом (I_E) называют количество калия гидроксида, выраженное в миллиграммах, необходимое для омыления эфиров, содержащихся в 1 г испытуемого вещества.

Метод 1

Эфирное число определяют по разности между числом омыления (I_S) и кислотным числом (I_A):

$$I_E = I_S - I_A.$$

Метод 2

1,5 – 2,0 г (точная навеска) испытуемого вещества помещают в коническую колбу вместимостью 250 мл, прибавляют 20 – 30 мл спирта 96 % и встряхивают. Прибавляют 1 мл фенолфталеина раствора 1 % и титруют калия гидроксида спиртовым раствором 0,5 М до появления бледно-розового окрашивания, не исчезающего в течение 30 с.

Прибавляют 25,0 мл калия гидроксида спиртового раствора 0,5 М и несколько стеклянных бусин. Присоединяют обратный холодильник и нагревают колбу на водяной бане при кипении раствора в течение 30 мин или времени, указанного в фармакопейной статье. Избыток калия гидроксида

оттитровывают хлористоводородной кислоты раствором 0,5 М. Проводят контрольный опыт в тех же условиях.

Эфирное число вычисляют по формуле:

$$I_{\text{E}} = \frac{28{,}05 \cdot (V_2 - V_1)}{a},$$

где V_1 – объем хлористоводородной кислоты раствора 0,5 М, израсходованный на титрование в основном опыте, мл;

V_2 – объем хлористоводородной кислоты раствора 0,5 М, израсходованный в контрольном опыте, мл;

a – навеска испытуемого вещества, г;

28,05 – количество калия гидроксида, содержащееся в 1 мл калия гидроксида спиртового раствора 0,5 М, мг.

При анализе окрашенных масел конечную точку титрования устанавливают потенциометрически.

Метод сжигания в колбе с кислородом **ОФС.1.2.3.0010.15**

Метод сжигания в колбе с кислородом применяется для определения содержания брома, йода, селена, серы, фосфора, фтора и хлора в лекарственных средствах.

Принцип метода состоит в разрушении органических веществ сжиганием в атмосфере кислорода, растворении образующихся продуктов сгорания в поглощающей жидкости и последующем определении элементов, находящихся в растворе в виде ионов.

Для определения используют коническую колбу из термостойкого стекла вместимостью 500 – 1000 мл со шлифом. В пробку колбы впаяна нихромовая, платиновая или платино-иридиевая проволока диаметром 0,7 – 0,8 мм, заканчивающаяся изготовленной из того же материала корзиночкой или спиралью на расстоянии 1,5 – 2,0 см от дна колбы (рис. 1).

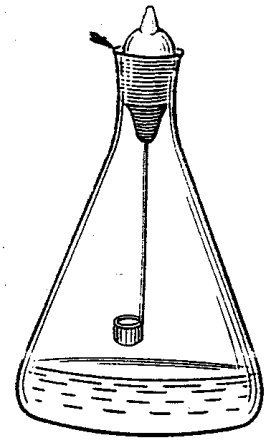


Рисунок 1 – Колба для сжигания в атмосфере кислорода

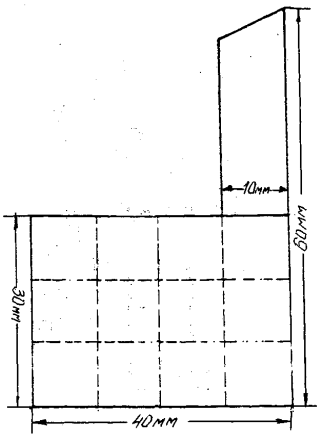


Рисунок 2 – Фильтровальная бумага для приготовления пакетика

Около 0,05 г (точная навеска) тонкоизмельченного образца испытуемого вещества или другое количество, указанное в фармакопейной статье, помещают в центр не содержащей галогенидов фильтровальной бумаги размером 30 × 40 мм, с выступающей узкой полоской шириной 10 мм и длиной 30 мм, заворачивают в виде пакетика, оставляя узкую полоску (рис. 2).

При исследовании жидкости навеску помещают в капилляр, заплавленный парафином, или в капсулу (полиэтиленовую, из нитропленки или метилцеллюлозы). При исследовании жидких образцов объемом не более 200 мкл возможно использование капсул из поликарбоната.

Для жидкостей возможно применение двойного бумажного пакетика.

При исследовании мазеобразных веществ применяют капсулу (вместимостью не более 200 мкл) из нитропленки или пакетик из вощеной жиронепроницаемой бумаги. Капсулу или пакетик заворачивают в фильтровальную бумагу, как указано выше.

Если при проведении определения требуется, чтобы фильтровальная бумага была пропитана лития карбонатом, следует увлажнить центр бумаги насыщенным раствором лития карбоната и высушить ее перед применением при 100 – 105 ºС.

При исследовании твердых и мазеобразных веществ, сгорающих со вспышкой, к навеске прибавляют 3 – 5 мг парафина.

Подготовленную пробу в пакетике из фильтровальной бумаги помещают в держатель (корзиночка или спираль). В колбу для сжигания наливают воду или другую поглощающую жидкость, указанную в фармакопейной статье, увлажняют горло колбы водой и пропускают в течение 3 – 5 мин ток кислорода через трубку, конец которой находится выше уровня жидкости. Затем осторожно поджигают узкий конец свободной полоски фильтровальной бумаги и немедленно плотно закрывают колбу пробкой, смоченной водой. Во время сжигания следует придерживать пробку рукой.

По окончании сжигания содержимое колбы встряхивают и оставляют на 30 – 60 мин при периодическом перемешивании. Стенки колбы, платиновую проволоку с корзиночкой и пробку промывают водой, промывные воды присоединяют к основному раствору и проводят определение элемента методом, указанным в фармакопейной статье.

Параллельно проводят контрольный опыт.

Примечание. При проведении работы необходимо надеть защитные очки, колбу поместить в предохранительный чехол, установить защитный экран. Колба для сжигания должна быть тщательно вымыта и свободна от следов органических веществ и растворителей.

Определение хлора и брома. Точную навеску вещества, указанную в фармакопейной статье, сжигают, как описано выше, используя в качестве поглощающей жидкости 20 мл водорода пероксида раствора 6 %. Стенки колбы и держатель образца обмывают 40 мл воды, прибавляют 5 капель бромфенолового синего раствора спиртового 0,1 % и нейтрализуют по каплям натрия гидроксида раствором 0,1 М до перехода желтой окраски в синюю. Затем прибавляют 1 мл азотной кислоты раствора 0,3 %, 5 капель раствора дифенилкарбазона и титруют ртути(II) нитрата раствором 0,005 М до перехода желтой окраски в светло-фиолетовую.

1 мл ртути(II) нитрата раствора 0,005 М соответствует 0,7091 мг хлора или 1,598 мг брома.

Определение йода. Точную навеску вещества, указанную в фармакопейной статье, сжигают, как описано выше, поглощая продукты сжигания 10 мл натрия гидроксида раствора 0,2 М. Шлиф и держатель обмывают 25 мл калия ацетата раствора 10 % в уксусной кислоте ледяной, к которому предварительно прибавляют 15 капель брома, затем пробку с держателем и стенки колбы тщательно промывают 40 мл воды, прибавляют по каплям муравьиную кислоту безводную 85 % до обесцвечивания раствора, 20 мл серной кислоты раствора 0,025 М, 0,5 г калия йодида и выдерживают в темном месте в течение 5 мин. Выделившийся йод титруют натрия тиосульфата раствором 0,1 М (индикатор – крахмал).

1 мл натрия тиосульфата раствора 0,1 М соответствует 2,115 мг йода.

Определение фтора. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение фтора».

Определение серы. Точную навеску вещества, указанную в фармакопейной статье, сжигают, как описано выше, используя в качестве поглощающей жидкости 15 мл водорода пероксида раствора 6 %. Держатель образца и стенки колбы обмывают 20 мл воды и упаривают содержимое колбы до 4 – 5 мл. К охлажденному раствору прибавляют 2 мл уксусной кислоты разведенной 30 %, 20 мл спирта 96 %, по 2 капли водного метиленового синего раствора 0,02 % и торина раствора 0,2 % и титруют бария нитрата раствором 0,01 М до перехода желто-зеленой окраски в розовую.

1 мл бария нитрата раствора 0,01 М соответствует 0,3207 мг серы.

Примечания.

1. Приготовление бария нитрата раствора 0,01 М. Около 2,614 г (точная навеска) бария нитрата растворяют в воде в мерной колбе вместимостью 1 л, доводят объем раствора водой до метки и фильтруют.

Установка титра. К 10 мл титрованного серной кислоты раствора 0,01 М прибавляют 40 мл воды, прибавляют по 2 капли метиленового синего раствора водного 0,02 % и торина раствора 0,2 % и медленно титруют приготовленным раствором бария нитрата до перехода желтой окраски в розовую.

1 мл серной кислоты раствора 0,01 М соответствует 2,614 мг бария нитрата.

2. Приготовление торина раствора 0,2 %. 0,2 г торина растворяют в 100 мл воды.

Раствор хранят в защищенном от света месте в течение 7 дней.

Определение фосфора. Точную навеску вещества, указанную в фармакопейной статье, сжигают, как описано выше, используя в качестве поглощающей жидкости 10 мл серной кислоты раствора 0,05 М. Определение фосфора проводят в соответствии с ОФС «Спектрофотометрическое определение фосфора».

Определение селена. Определение проводят в соответствии с ОФС «Селен».

Определение азота в органических соединениях методом Къельдаля	**ОФС.1.2.3.0011.15** **Взамен ГФ X** **Взамен ст. ГФ XI, вып. 1** **Взамен ГФ XII, ч.1,** **ОФС 42-0052-07**

Метод основан на минерализации лекарственного средства под воздействием серной кислоты концентрированной при нагревании в присутствии катализаторов. В качестве катализаторов возможно использование смеси калия сульфата, меди сульфата и/или селена и/или титана диоксида. При этом азот превращается в аммония сульфат. При прибавлении натрия гидроксида выделяется аммиак, который перегоняют с паром в приемник, содержащий кислоту для его поглощения: борную – в методе прямого титрования (1 и 2); серную или хлористоводородную – в методе обратного титрования (3). В методах 1 и 2 поглощенный аммиак титруют раствором хлористоводородной или серной кислоты, в методе 3 избыток кислоты оттитровывают раствором натрия гидроксида. По результатам титрования рассчитывают содержание азота.

Различают следующие варианты метода:

1) метод Къельдаля,

2) микрометод Къельдаля,

3) метод Къельдаля (обратное титрование).

Прибор для определения азота (рисунок) состоит из парообразователя – круглодонной колбы (1) вместимостью 3 л с предохранительной трубкой (2), сменных колб Къельдаля с длинным горлом (3) для конденсации водяных

паров и защиты от потери вещества, воронки (4) с зажимом или краном (5) для прибавления натрия гидроксида, брызгоуловителя (6), прямого холодильника (7) и сменных конических колб-приемников (8). Стеклянная посуда должна быть термостойкой. Работу на приборе осуществляют в вытяжном шкафу.

Вместо описанного прибора могут быть использованы установки для автоматического определения азота по Къельдалю, определение проводят потенциометрически.

1. Метод Къельдаля

В колбу Къельдаля (3) вместимостью 200 – 300 мл (другие объемы от 50 до 500 мл должны быть указаны в фармакопейной статье) помещают точную навеску (указывают в фармакопейной статье) или точный объем образца лекарственного средства (0,5 – 10,0 мл) с содержанием азота около 14 – 35 мг (если требуется пробоподготовка, она должна быть описана в фармакопейной статье), три стеклянных шарика для пенящихся веществ и 1 г растертой смеси калия сульфата и меди сульфата, взятых в соотношении 10 : 1 (другой состав смеси катализаторов должен быть указан в фармакопейной статье). Для трудносжигаемых веществ дополнительно в колбу (3) прибавляют 0,05 г металлического селена и/или 1 мл концентрированного раствора водорода пероксида. Прибавляют 7 мл серной кислоты концентрированной и осторожно вращают колбу для стекания кислоты со стенок и ее перемешивания с содержимым колбы. Постепенно нагревают колбу (3), закрытую стеклянной воронкой, на электронагревательном приборе и далее кипятят содержимое в течение нескольких часов до получения раствора светло-зеленого цвета. На стенках колбы не должно оставаться обугленного вещества. Кипячение продолжают еще 30 мин или более до просветления раствора. Если при кипячении происходит сильное пенообразование, то рекомендуется снять колбу Къельдаля с нагревательного прибора и дать пене осесть, затем снова продолжают нагревание, не допуская попадания пены в горло колбы. После охлаждения

колбы Къельдаля в нее осторожно прибавляют 20 мл воды, вращая колбу для перемешивания содержимого, вновь охлаждают и присоединяют колбу к собранному прибору для определения азота (рисунок), заранее промытому путем пропускания через него пара. В парообразователь наливают воду, не менее половины объема, подкисленную 0,5 М или 0,05 М раствором серной кислоты по индикатору метиловому красному (2 – 3 капли) до слабо-розового цвета, для связывания аммиака, который может попасть из воздуха. Для обеспечения равномерного кипения воды в парообразователь помещают стеклянные шарики. В приемник перед началом отгонки наливают 20 мл борной кислоты раствора 4 % и прибавляют 0,25 мл (5 капель) смешанного индикатора. Нижний конец внутренней трубки холодильника должен быть опущен в раствор, находящийся в приемнике. После сборки прибора в холодильник пускают воду и доводят до кипения воду в парообразователе. Затем в колбу (3) из воронки медленно по каплям прибавляют 40 мл натрия гидроксида раствора 30 %, следя за тем, чтобы раствор в колбе (3) энергично перемешивался поступающим паром. Для обеспечения большей герметичности прибора в воронке следует оставлять некоторый избыток натрия гидроксида раствора 30 %. Собирают около 100 мл отгона (или количество, указанное в фармакопейной статье). Во время отгонки колбу Къельдаля нагревают так, чтобы объем жидкости в ней оставался постоянным. По окончании отгонки приемник опускают таким образом, чтобы трубка холодильника находилась над поверхностью жидкости, находящейся в приемнике. Трубку холодильника промывают снаружи водой, продолжая подачу пара в колбу (3) в течение 1 – 2 мин; промывную воду собирают в тот же приемник. После этого прекращают нагревание парообразователя и немедленно отсоединяют колбу Кьельдаля от прибора. По окончании отгонки дистиллят титруют хлористоводородной кислоты раствором 0,1 М или серной кислоты раствором 0,05 М (должно быть указано в фармакопейной статье) до перехода окраски смешанного индикатора из зеленой в красно-фиолетовую.

Проводят контрольный опыт таким же образом и с теми же реактивами, но без испытуемого образца; полученный результат используют для внесения поправки при расчете содержания азота.

1 мл хлористоводородной кислоты раствора 0,1 М или серной кислоты раствора 0,05 М соответствует 1,401 мг азота.

2. Микрометод Къельдаля

В колбу Къельдаля вместимостью от 50 до 250 мл помещают точную навеску или указанный в фармакопейной статье объем образца лекарственного средства с содержанием азота 1,4 – 3,5 мг. Остальные операции проводят, как указано выше в методе 1, используя описанную ранее смесь катализаторов или (например, в лекарственных средствах, выделенных из природных источников или полученных биотехнологическими методами) 0,25 г смеси калия сульфата, меди сульфата и натрия селената в соотношении 20:5:8,5; в этом случае вместо 7 мл прибавляют 4 мл серной кислоты концентрированной (для лучшего смачивания испытуемого образца).

Минерализацию проводят до тех пор, пока раствор не станет прозрачным. После этого нагревание продолжают еще 30 мин. В конце минерализации прибавляют 1 – 3 капли концентрированного раствора водорода пероксида и продолжают нагревание в течение 10 мин до обесцвечивания раствора.

Титрование выделенного аммиака проводят хлористоводородной кислоты раствором 0,01 М или серной кислоты раствором 0,005 М.

1 мл хлористоводородной кислоты раствора 0,01 М или серной кислоты раствора 0,005 М соответствует 0,1401 мг азота.

Если навеска содержит более чем 3,5 мг азота, допускается использовать хлористоводородной кислоты раствор 0,02 М или серной кислоты раствор 0,01 М (при этом на титрование должно расходоваться не менее 15 мл титранта). Если масса взятой навески безводного вещества превышает 100 мг, необходимо пропорционально увеличивать объемы серной кислоты концентрированной и раствора натрия гидроксида.

3. Метод Къельдаля (обратное титрование)

А. После минерализации образца лекарственного средства (методы 1 или 2) в приемник помещают точно отмеренное количество (от 10,0 до 25,0 мл) взятой в избытке хлористоводородной или серной кислоты (объем и молярная концентрация раствора кислоты зависят от содержания азота в препарате; указывают в фармакопейной статье).

По окончании отгонки аммиака содержимое приемника титруют натрия гидроксида раствором 0,1 М (или 0,01 М, что должно быть указано в фармакопейной статье) в присутствии смешанного индикатора (если не указано иначе в фармакопейной статье) до перехода окраски из красно-фиолетовой в зеленую.

Проводят контрольный опыт таким же образом и с теми же реактивами, но без испытуемого образца или с использованием 0,050 г глюкозы, о чем должно быть указано в фармакопейной статье.

Содержание азота в лекарственном средстве в процентах (X_1) или в мг/мл (X_2) вычисляют по формулам:

$$X_1 = \frac{(V_0 - V_1) \cdot K \cdot \text{Т} \cdot 10^{-3} \cdot 100}{a},$$

$$X_2 = \frac{(V_0 - V_1) \cdot K \cdot \text{Т}}{V},$$

где: V_0 – объем 0,1 М раствора натрия гидроксида, израсходованный на титрование контрольного раствора, мл;

V_1 – объем 0,1 М раствора натрия гидроксида, израсходованный на титрование испытуемого раствора, мл;

K – поправочный коэффициент к титру раствора натрия гидроксида;

Т – 1,401 мг/мл – титр 0,1М раствора гидроксида натрия по азоту;

a – навеска образца лекарственного средства, г;

V – объем раствора, взятый для анализа, мл.

Б. ***Данный метод применяют преимущественно в препаратах крови***. В колбу Къельдаля с помощью калиброванной пипетки вносят 0,5 – 1,0 мл испытуемого раствора, содержащего 8 – 32 мг азота (или 50 – 200 мг

белка), затем вносят растертую смесь (около 1 г) калия сульфата и меди сульфата (3:1) и от 2 до 4 мл серной кислоты концентрированной в зависимости от содержания белка. Содержимое колбы кипятят. Для ускорения сжигания несколько раз прибавляют по 5 капель концентрированного раствора водорода пероксида и продолжают кипятить, пока раствор не станет голубым или бесцветным. По окончании сжигания смесь охлаждают. В парообразователь наливают воду, нагревают до кипения и проверяют аппарат на герметичность. Присоединяют колбу Къельдаля к прибору для определения азота или количественно переносят содержимое колбы в реакционный сосуд прибора, используя 30 мл воды. Отгон собирают в приемник, куда предварительно наливают от 10,0 до 25,0 мл серной кислоты раствора 0,05 М в зависимости от содержания белка. Приемник присоединяют так, чтобы нижний конец трубки холодильника был опущен в раствор. Воду в парообразователе нагревают до кипения. В колбу Къельдаля или в реакционный сосуд прибора с минерализатом через воронку прибавляют около 20 мл натрия гидроксида раствора 15 М до появления коричневой окраски минерализата. После этого быстро и герметично закрывают зажим воронки и отгоняют аммиак в течение 5 мин. Затем опускают приемник с серной кислоты раствором 0,05 М так, чтобы нижний конец трубки холодильника не касался поверхности жидкости, и продолжают перегонку еще 5 мин. Отгон титруют натрия гидроксида раствором 0,1 М до перехода сиреневой окраски в зеленую (индикатор – 0,05 мл смешанного индикатора). Параллельно проводят контрольный опыт.

1 мл натрия гидроксида раствора 0,1 М соответствует 1,401 мг азота.

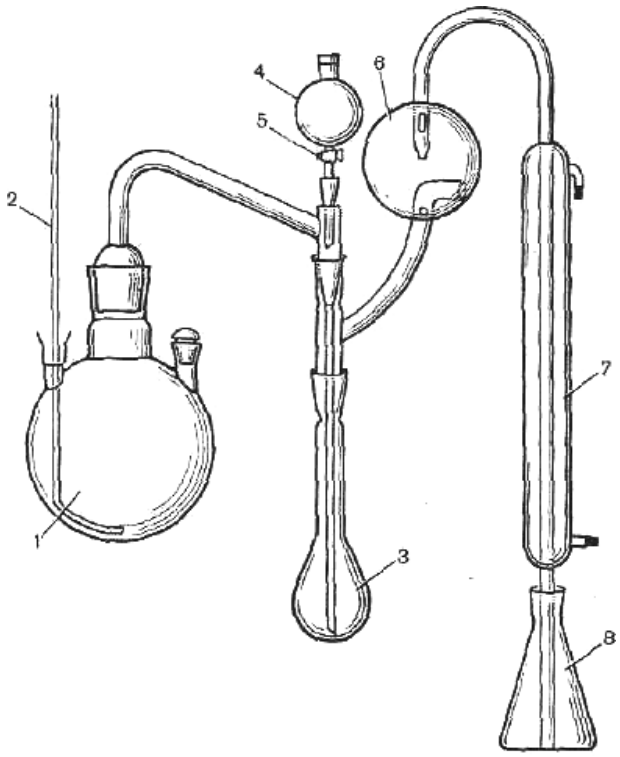


Рисунок – Прибор для определения азота**.**

1 – парообразователь; 2 – предохранительная трубка; 3 – колба Къельдаля; 4 – воронка; 5 – кран или зажим; 6 – брызгоуловитель; 7 – холодильник; 8 – колба-приемник

Определение белка	**ОФС.1.2.3.0012.15** **Взамен ОФС 42-0014-03** **Взамен ст. ГФ XII, ч.1, ОФС 42-0053-07**

Определение содержания белка проводят в лекарственных средствах, выделенных из природных источников или полученных биотехнологическими методами.

Для таких лекарственных средств могут использоваться модифицированные методики определения белка, указанные в фармакопейных статьях, в которых могут быть изменены рекомендуемые области концентраций белка и/или объемы испытуемого раствора и реактивов и некоторые другие условия в соответствии с индивидуальными свойствами определяемого компонента.

Колориметрические и некоторые спектрофотометрические методы требуют использования стандартного образца. В качестве стандартного образца белка используют: стандартный образец присутствующего в препарате белка, или бычий сывороточный альбумин, или сывороточный альбумин человека, высушенные перед испытанием до постоянной массы (стандартный образец и условия высушивания указывают в фармакопейной статье).

Для количественного определения белка используют спектрофотометрические, колориметрические и спектрофлуориметрические методы.

Метод 1 (Спектрофотометрический)

Метод основан на способности ароматических аминокислот (тирозина, триптофана и, в меньшей степени, фенилаланина), входящих в последовательность молекулы белка, поглощать ультрафиолетовый свет при длине волны около 280 нм.

Для растворения молекул белка используют различные растворители: воду, натрия хлорид раствор 0,9 %, различные буферные растворы и др.

При использовании буферного раствора для растворения молекул белка, имеющего высокое значение оптической плотности по отношению к воде, свидетельствует о присутствии в белковой молекуле интерферирующего вещества. Для устранения влияния интерферирующего вещества на результаты анализа следует использовать в качестве раствора сравнения вместо воды буферный раствор. Если интерферирующие вещества имеют высокую оптическую плотность, результаты анализа могут быть подвергнуты сомнению.

При низких концентрациях белок адсорбируется на стенках кюветы, что может приводить к заниженным результатам содержания белка в растворе. В этом случае испытуемый раствор препарата предварительно концентрируют или используют при приготовлении испытуемого раствора неионные детергенты.

Испытуемый раствор. Готовят раствор испытуемого вещества в буферном растворе, указанном в фармакопейной статье, с концентрацией белка от 0,2 мг/мл до 2,0 мг/мл.

Стандартный раствор. Готовят раствор соответствующего стандартного образца в том же буферном растворе и с той же концентрацией белка, что и в испытуемом растворе.

Методика. Испытуемый раствор, стандартный раствор и раствор сравнения выдерживают при одинаковой температуре. Температуру и время инкубации указывают в фармакопейной статье. Определяют оптические плотности испытуемого и стандартного растворов в кварцевых кюветах при

длине волны 280 нм, используя тот же буферный раствор в качестве раствора сравнения.

Для получения достоверных и точных результатов значения оптической плотности растворов должны удовлетворять требованиям линейности в интервале определяемых концентраций белка.

Для высокоочищенных белков концентрацию белка в растворе вычисляют с использованием удельного показателя поглощения.

Рассеяние света. Точность определения содержания белка в ультрафиолетовой области снижается, если белки в растворе существуют в виде частиц, сравнимых по размеру с длиной волны измеряемого света (250 – 300 нм). Рассеяние светового потока приводит к увеличению оптической плотности испытуемого раствора. При расчете оптической плотности испытуемого раствора при длине волны 280 нм, обусловленной рассеянием света, определение проводят при длинах волн 320 нм, 325 нм, 330 нм, 335 нм, 340 нм и 350 нм. Строят график зависимости десятичного логарифма (lg) оптической плотности от lg соответствующей длины волны. Экстраполируют кривую методом линейной регрессии для определения логарифма оптической плотности при длине волны 280 нм. Антилогарифм этого значения соответствует оптической плотности за счет рассеяния света. Для расчета истинного содержания белка в испытуемом растворе оптическую плотность раствора, полученную при 280 нм, корректируют, вычитая оптическую плотность, относящуюся к рассеянному свету.

Снизить эффект рассеянного света в опалесцирующих растворах можно фильтрованием через фильтр с размером пор 0,2 мкм, не адсорбирующим белок, или центрифугированием. Условия фильтрования и центрифугирования указывают в фармакопейной статье.

Расчеты. Концентрацию белка в испытуемом растворе (C) в мг/мл вычисляют по формуле:

$$C = C_0 \cdot A/A_0, \quad \text{где}$$

C_0 – концентрация белка в растворе стандартного образца, в мг/мл;

A и A_0 – скорректированные значения оптической плотности испытуемого раствора и раствора стандартного образца соответственно.

Метод 2 (Метод Лоури, колориметрический)

Метод основан на реакции белков с солями меди (II) в щелочном растворе и восстановлении фосфорномолибдено-вольфрамового реактива (реактив Фолина) с образованием окрашенных продуктов, интенсивность окраски которых определяют по оптической плотности при длине волны 750 нм. Реактив Фолина взаимодействует с остатками ароматических аминокислот белка, главным образом тирозина, а также триптофана и фенилаланина и, в меньшей степени, цистеина. Развитие окраски достигает максимума через 20 – 30 мин при комнатной температуре, в дальнейшем идет уменьшение ее интенсивности. Степень окрашивания зависит от природы белка. Поскольку различные виды белков могут давать цветные реакции различной интенсивности, испытуемый белок должен соответствовать стандартному образцу.

Определению мешают некоторые соли, тиоловые соединения, углеводы, липиды, неионные детергенты, органические растворители, комплексоны и некоторые другие соединения. Большинство мешающих веществ дает слабое окрашивание, однако применение некоторых детергентов приводит к значительному увеличению окраски. Высокая концентрация соли может являться причиной образования осадка. Для уменьшения влияния веществ, мешающих определению, проводят дополнительное разведение раствора, обеспечивающее концентрацию испытуемого белка на уровне, достаточном для проведения точных измерений, или осаждение белков растворами натрия дезоксихолата и трихлоруксусной кислоты.

Стандартные растворы. Растворяют соответствующий стандартный образец белка в буферном растворе, указанном в фармакопейной статье. Части полученного раствора разводят в том же буферном растворе для

получения не менее чем пяти стандартных растворов, имеющих концентрации белка, равномерно распределенные в интервале между 5 мкг/мл и 100 мкг/мл.

Испытуемый раствор. Готовят раствор испытуемого лекарственного средства в буферном растворе, указанном в фармакопейной статье, с концентрацией белка, находящейся в пределах интервала концентраций калибровочного графика.

Контрольный раствор. Используют буферный раствор, применяемый для приготовления стандартных и испытуемого растворов.

Метод А (без предварительного осаждения белка). К 1,0 мл каждого из стандартных растворов, испытуемого раствора и к 1,0 мл контрольного раствора, прибавляют по 5,0 мл реактива В. Содержимое пробирок перемешивают и оставляют на 10 – 30 мин при комнатной температуре. Затем в каждую пробирку прибавляют 0,5 мл реактива Фолина, разбавленного перед употреблением водой в 2 раза, быстро и тщательно перемешивают и оставляют на 30 мин при комнатной температуре. Измеряют оптическую плотность испытуемого и стандартных растворов на спектрофотометре при длине волны 750 нм (или указанной в фармакопейной статье), используя контрольный раствор в качестве раствора сравнения. Окраска остается стабильной в течение 2 часов. Допускается использование коммерческого реактива Фолина-Чокалтеу.

Зависимость оптической плотности от концентрации белка носит нелинейный характер, тем не менее, если интервал концентраций, используемых для построения калибровочного графика, небольшой, то она приближается к линейной. Строят зависимости оптических плотностей стандартных растворов от концентраций белка и используют линейную регрессию для построения калибровочной кривой. На основании калибровочной кривой и оптической плотности испытуемого раствора определяют концентрацию белка в испытуемом растворе.

Калибровочный график строят каждый раз при приготовлении новых реактивов или использовании другого спектрофотометра, но не реже 1 раза в 3 мес.

Примечания:

1. Приготовление реактива А. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 2 г натрия карбоната, растворяют в 0,1 М растворе натрия гидроксида и доводят объем до метки этим же раствором, перемешивают.

Срок годности раствора 1 мес.

2. Приготовление реактива Б. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 0,5 г меди сульфата, 1 г калия-натрия тартрата, растворяют в воде и доводят до метки.

Срок годности раствора: 2 мес.

3. Приготовление реактива В. Перед анализом смешивают 50,0 мл реактива А и 1,0 мл реактива Б.

Метод Б (с натрия додецилсульфатом). Определение проводят, как описано в методе А, но вместо 5 мл реактива В к растворам прибавляют по 1 мл щелочного реактива меди и по 0,5 мл разведенного реактива Фолина.

Примечания:

1. Приготовление сульфатного реактива меди. В мерной колбе вместимостью 100 мл растворяют в воде 0,2 г меди сульфата и 0,4 г натрия тартрата, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. В мерной колбе вместимостью 100 мл растворяют в воде 10 г натрия карбоната, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Медленно приливают раствор натрия карбоната к раствору меди сульфата при перемешивании. Раствор используют в течение 24 часов.

2. Приготовление щелочного реактива меди. 1 объем полученного раствора сульфатного реактива меди смешивают с 2 объемами 5 % раствора натрия додецилсульфата (50 г/л) и 1 объемом 3,2 % раствора натрия гидроксида
(32 г/л).

Срок годности раствора: 2 недели при комнатной температуре.

3. Приготовление разведенного реактива Фолина. Смешивают 5 мл реактива Фолина с 55 мл воды.

Раствор хранят в банках темного стекла при комнатной температуре.

Метод В (с предварительным осаждением белка).

Методика. К 1,0 мл испытуемого раствора прибавляют 0,1 мл раствора натрия дезоксихолата. Раствор перемешивают на вихревой мешалке и

выдерживают при комнатной температуре в течение 10 мин. Прибавляют 0,1 мл 72 % раствора трихлоруксусной кислоты и перемешивают на вихревой мешалке. Осадок отделяют центрифугированием в течение 30 мин при 3000 g. Осторожно удаляют надосадочную жидкость, оставшийся осадок растворяют в 1 мл щелочного реактива меди. Далее поступают, как описано выше в методе Б.

При построении калибровочного графика стандартные растворы белка следует обрабатывать аналогичным способом.

В качестве раствора сравнения используют пробу, содержащую 0,1 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида, 0,9 мл воды, 5,0 мл реактива В и 0,5 мл разбавленного в 2 раза реактива Фолина.

Примечания:

1. Приготовление 0,15 % раствора натрия дезоксихолата. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 0,15 г натрия дезоксихолата и растворяют в воде. Объем раствора доводят до метки водой и тщательно перемешивают.

2. Приготовление 72 % раствора трихлоруксусной кислоты. В мерную колбу вместимостью 500 мл помещают 360 г трихлоруксусной кислоты и растворяют в воде. Объем раствора доводят до метки водой и тщательно перемешивают.

Срок годности 72 % раствора трихлоруксусной кислоты 1 мес.

Метод 3 (Метод Бредфорд, колориметрический)

Данный метод основан на смещении максимума поглощения оптической плотности красителя кислотного синего 90 (Кумасси бриллиантовый синий R-250) от 470 нм до 595 нм, наблюдаемой вследствие связывания белка с красителем. Краситель наиболее активно связывается с остатками аргинина и лизина белка, что может приводить к погрешности при количественном определении различных видов белков. Белок, используемый в качестве стандартного образца, должен быть таким же, как испытуемый белок.

Существует относительно небольшое влияние интерферирующих веществ, которого можно избежать, не используя детергенты и амфолиты в

испытуемом образце. Сильнощелочные образцы могут взаимодействовать с кислотным реактивом.

Стандартные растворы. Растворяют соответствующий стандартный образец белка в буферном растворе, указанном в фармакопейной статье. Части полученного раствора разводят в том же буферном растворе для получения не менее чем пяти стандартных растворов, имеющих концентрации белка, равномерно распределенные в интервале между 0,1 мг/мл и 1 мг/мл.

Испытуемый раствор. Готовят раствор испытуемого лекарственного средства в буферном растворе, указанном в фармакопейной статье, с концентрацией белка, находящейся в пределах интервала концентраций калибровочного графика.

Контрольный раствор. Используют буферный раствор, применяемый для приготовления стандартных и испытуемого растворов.

Методика. Прибавляют 5 мл реактива Бредфорд к 0,1 мл каждого стандартного раствора, испытуемого раствора и контрольного раствора. Тщательно перемешивают, переворачивая. Избегают образование пены, приводящей к плохой воспроизводимости. Выдерживают при комнатной температуре в течение 10 мин и измеряют оптические плотности стандартных растворов и испытуемого раствором на спектрофотометре при длине волны 595 нм, используя контрольный раствор в качестве раствора сравнения, содержащего растворитель и реактив Бредфорд. При определении не следует использовать кварцевые спектрофотометрические кюветы, поскольку краситель связывается с этими материалами. Окраска остается стабильной в течение 1 ч.

Зависимость оптической плотности от концентрации белка носит нелинейный характер, тем не менее, если интервал концентраций, используемых для построения калибровочного графика, небольшой, то она приближается к линейной. Строят зависимости оптических плотностей стандартных растворов от концентраций белка и используют линейную

регрессию для построения калибровочной кривой. На основании калибровочной кривой и оптической плотности испытуемого раствора определяют концентрацию белка в испытуемом растворе.

В нормативных документах допускается изменение объемов испытуемого раствора и реактива Бредфорд при соблюдении линейной зависимости оптической плотности от концентрации белка при построении калибровочного графика.

Калибровочный график строят каждый раз при приготовлении новых реактивов или использовании другого спектрофотометра, но не реже 1 раза в 3 мес.

Примечание:

Приготовление реактива Бредфорд. В мерную колбу вместимостью 500 мл помещают 0,05 г кислотного синего 90 (Кумасси бриллиантовый синий R-250), растворяют в 25 мл спирта 96%, прибавляют 50 мл фосфорной кислоты концентрированной, доводят объем раствора водой до метки и тщательно перемешивают. Фильтруют и хранят в банках темного стекла при комнатной температуре. Если при хранении выпадает осадок красителя, перед использованием реактив необходимо профильтровать.

Срок годности 2 недели.

Метод 4 (Метод с бицинхониновой кислотой, колориметрический)

Метод основан на восстановлении ионов меди Cu^{2+} до ионов меди Cu^{1+} при взаимодействии с остатками цистеина, цистина, триптофана, тирозина, пептидной связью белка и образовании окрашенного комплекса Cu^{+} с бицинхониновой кислотой (2,2’-бихинолин-4,4’-дикарбоновая кислота). Определению мешают восстанавливающие вещества: сахара, аскорбиновая кислота, тиоловые соединения, этилендиаминтетраацетат. Влияние мешающих веществ может быть минимизировано путем разведения, обеспечивающего концентрацию белка на уровне, достаточном для проведения точных измерений. В качестве альтернативы можно использовать методику осаждения белка, описанную в определении белка по методу Лоури. Поскольку интенсивность окраски образующегося комплекса зависит

от природы белка, белок стандартного образца должен быть тот же, что и в испытуемом образце.

Стандартные растворы. Соответствующий стандартный образец белка растворяют в буферном растворе, указанном в фармакопейной статье. Части полученного раствора разводят в том же буферном растворе для получения не менее чем пяти стандартных растворов, имеющих концентрации белка, равномерно распределенные в интервале между 10 мкг/мл и 1200 мкг/мл.

Испытуемый раствор. Готовят раствор испытуемого лекарственного средства в буферном растворе, указанном в фармакопейной статье, с концентрацией белка, находящейся в пределах интервала концентраций калибровочного графика.

Контрольный раствор. Используют буферный раствор, применяемый для приготовления стандартных и испытуемого растворов.

Методика. Прибавляют к 0,1 мл каждого стандартного раствора, испытуемого раствора и контрольного раствора 2,0 мл реактива медно-бицинхониновой кислоты. Растворы выдерживают при температуре 37 ºС в течение 30 мин, засекают время и охлаждают смесь до комнатной температуры. Через 60 мин после окончания инкубации при 37 ºС измеряют оптические плотности стандартных растворов и испытуемого раствора на спектрофотометре при длине волны 562 нм в кварцевых кюветах, используя контрольный раствор в качестве раствора сравнения.

Зависимость оптической плотности от концентрации белка носит нелинейный характер, тем не менее, если интервал концентраций, используемых для построения калибровочного графика, небольшой, то она приближается к линейной. Строят зависимости оптических плотностей стандартных растворов от концентраций белка и используют линейную регрессию для построения калибровочной кривой. На основании калибровочной кривой и оптической плотности испытуемого раствора определяют концентрацию белка в испытуемом растворе.

Примечания:

1. *Приготовление реактива бицинхониновой кислоты*. В мерную колбу вместимостью 1 л помещают 10 г динатриевой соли бицинхониновой кислоты, 20 г натрия карбоната моногидрата, 1,6 г натрия тартрата, 4 г натрия гидроксида, 9,5 г натрия гидрокарбоната, растворяют в воде. При необходимости значение pH полученного раствора доводят до 11,25 раствором натрия гидроксида 10 % или натрия гидрокарбоната 5 %. Доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

2. *Приготовление реактива медно- бицинхониновой кислоты.* Смешивают 1,0 мл 4 % раствора меди сульфата (40 г/л) и 50,0 мл реактива бицинхониновой кислоты.

Метод 5 (Колориметрический метод с биуретовым реактивом)

Метод основан на взаимодействии ионов двухвалентной меди с пептидными связями молекулы белка в щелочной среде с образованием окрашенного комплекса, оптическая плотность которого измеряется при длине волны 540 нм. Этот метод показывает минимальные различия между равными количествами иммуноглобулиновых и альбуминовых белков.

Метод не рекомендован для проведения реакции в растворах, содержащих соли аммония, а также для мутных или образующих осадок растворов. Для устранения влияния мешающих веществ проводят осаждение белка из раствора испытуемого образца следующим образом: к 1 объему раствора испытуемого образца прибавляют 0,1 объем 50 % раствора трихлоруксусной кислоты, перемешивают на вихревой мешалке и выдерживают при комнатной температуре в течение 10 мин, центрифугируют при 3000 g в течение 30 мин. Удаляют надосадочную жидкость и растворяют осадок в небольшом объеме 0,5 М раствора натрия гидроксида. Полученный раствор используют для приготовления испытуемого раствора.

При построении калибровочного графика стандартные растворы белка следует обрабатывать аналогичным способом.

Стандартные растворы. Если иное не указано в фармакопейной статье, растворяют соответствующий стандартный образец белка в 0,9 %

растворе натрия хлорида. Части полученного раствора разводят 0,9 % раствором натрия хлорида для получения не менее трех стандартных растворов с концентрациями в интервале от 2 мг/мл до 10 мг/мл.

Испытуемый раствор. Готовят раствор испытуемого лекарственного средства в 0,9 % растворе натрия хлорида с концентрацией белка, находящейся в пределах интервала концентраций стандартных растворов.

Контрольный раствор. Используют 0,9 % раствор натрия хлорида.

Методика. К 1,0 мл испытуемого раствора, каждого из стандартных растворов и контрольного раствора прибавляют 4,0 мл биуретового реактива, перемешивают и оставляют при комнатной температуре на 30 мин. Измеряют оптическую плотность испытуемого и стандартных растворов при длине волны 540 нм, используя контрольный раствор в качестве раствора сравнения (или указанной в фармакопейной статье, в пределах 540 – 650 нм).

Зависимость оптической плотности от концентрации белка носит нелинейный характер. Однако в небольшом интервале концентраций, используемых для построения калибровочного графика, она приближается к линейной. Строят график зависимости оптических плотностей стандартных растворов от концентраций белка и используют линейную регрессию для построения калибровочной кривой. На основании калибровочной кривой и оптической плотности испытуемого раствора определяют концентрацию белка в испытуемом растворе.

Калибровочный график строят каждый раз при приготовлении новых реактивов или использовании другого спектрофотометра, но не реже 1 раза в 3 мес.

Примечание:

Приготовление 50 % раствора трихлоруксусной кислоты. В мерную колбу вместимостью 500 мл помещают 250 г трихлоруксусной кислоты и растворяют в воде. Объем раствора доводят до метки водой и тщательно перемешивают.

Срок годности 50 % раствора трихлоруксусной кислоты 1 мес.

Метод 6 (Флуорометрический метод с о-фталальдегидом)

Метод основан на дериватизации белка *о*-фталальдегидом, который реагирует с первичными аминогруппами белка (N-концевая аминокислота и ε-аминогруппа остатков лизина) с последующим измерением флуоресценции полученного комплекса. Чувствительность количественного определения может быть увеличена гидролизом белка перед добавлением *о*-фталальдегида. Гидролиз делает α-аминогруппу, входящую в структуру аминокислот, доступной для взаимодействия с фталальдегидным реактивом. Метод является высокочувствительным и требует небольшого количества белка.

Определению мешают буферные растворы, содержащие первичные амины, такие как трис(гидроксиметил)аминометан, и аминокислоты, которые взаимодействуют с *о*-фталальдегидом. Аммиак в больших концентрациях также взаимодействует с *о*-фталальдегидом. Флуоресценция, полученная при взаимодействии аминов с *о*-фталальдегидом, может быть нестабильной. Использование автоматизированных методик для стандартизации данного метода позволяет повысить точность и воспроизводимость определения.

Стандартные растворы. Растворяют соответствующий стандартный образец белка в 0,9 % растворе натрия хлорида. Части полученного раствора разводят 0,9 % раствором натрия хлорида для получения не менее пяти стандартных растворов с концентрациями в интервале от 10 мкг/мл до 200 мкг/мл. Доводят значение pH раствора до 8,0 - 10,5 перед добавлением фталальдегидного реактива.

Испытуемый раствор. Готовят раствор испытуемого лекарственного средства в 0,9 % растворе натрия хлорида с концентрацией белка, находящейся в пределах интервала концентраций стандартных растворов. Доводят значение pH раствора до 8,0-10,5 перед добавлением фталальдегидного реактива.

Контрольный раствор. Используют 0,9 % раствор натрия хлорида.

Методика. Смешивают 10 мкл испытуемого раствора, каждого из стандартных растворов и контрольного раствора с 0,1 мл фталальдегидного реактива и выдерживают при комнатной температуре в течении 15 мин. Прибавляют 3 мл 0,5 М раствора натрия гидроксида и перемешивают. Определяют интенсивность флуоресценции испытуемого раствора и каждого из стандартных растворов при длине волны возбуждения 340 нм и длине волны испускания между 440 нм и 455 нм, используя контрольный раствор в качестве раствора сравнения. Измеряют интенсивность флуоресценции указанных растворов только один раз, поскольку излучение снижает интенсивность флуоресценции.

Зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации белка носит линейный характер. Строят график зависимости интенсивностей флуоресценции стандартных растворов от концентраций белка и используют линейную регрессию для построения калибровочной кривой. На основании калибровочной кривой и интенсивности флуоресценции испытуемого раствора определяют концентрацию белка в испытуемом растворе.

Калибровочный график строят каждый раз при приготовлении новых реактивов или использовании другого спектрофлуориметра, но не реже 1 раза в 3 мес.

Примечания:

Приготовление боратного буферного раствора. В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 61,83 г борной кислоты и растворяют в воде и доводят pH до значения 10,4 при помощи раствора калия гидроксида. Объем раствора доводят до метки водой и тщательно перемешивают.

Приготовление исходного раствора фталальдегида. 1,20 г фталальдегида растворяют в 1,5 мл метанола, прибавляют 100 мл боратного буферного раствора и перемешивают. Прибавляют 0,6 мл 30 % раствора макрогол 23 лаурилового эфира (300 г/л) и перемешивают.

Хранят при комнатной температуре и используют в течение 3 недель.

Приготовление фталальдегидного реактива. К 5 мл исходного раствора фталальдегида прибавляют 15 мкл 2-меркаптоэтанола. Раствор следует готовить не менее чем за 30 мин перед использованием.

Используют в течение 24 часов.

Метод 7 (Определение белка по содержанию азота)

Определение белка по содержанию азота основано на том, что содержание азота в большинстве белков практически одинаково и может быть принято равным 16 %. По количеству найденного азота во взятой пробе рассчитывают содержание белка в лекарственном средстве, используя коэффициент пересчета азота на белок, равный 6,25.

На результаты определения будут оказывать влияние другие азотсодержащие вещества, присутствующие в испытуемом образце.

Методика определение белка по содержанию азота основана на разложении испытуемого образца в ходе проведения анализа, но не лимитирована содержанием белка в водной среде. При нагревании азотсодержащего органического соединения с серной кислотой концентрированной, азот превращается в аммония сульфат, который можно определить количественно.

Метод А **(Метод Къельдаля)**

Определение проводят в соответствии с требованиями, указанными в ОФС «Определение азота в органических соединениях» (метод 2 – микрометод Къельдаля) из точной навески препарата, содержащей 10 – 20 мг белка. После минерализации азотсодержащего органического соединения с серной кислотой концентрированной азот превращается в аммония сульфат, который можно определить количественно.

Метод Б

Большинство приборов для определения азота используют пиролиз, то есть сжигание образца в кислороде при температуре приблизительно 1000 °С, в ходе которого выделяется азота монооксид (NO) и другие оксиды азота (NO_x), из азота присутствующего в испытуемом веществе. Некоторые приборы преобразуют оксиды азота в азот, который количественно определяется с помощью детектора по теплопроводности. В других приборах азота монооксид (NO) смешивается с озоном (O_3) для получения азота диоксида (NO_2^*) в возбужденном состоянии, испускающего свет при

распаде, который может быть количественно определен с помощью хемилюминесцентного детектора. Для оптимизации навески и параметров пиролиза и обеспечения стабильности показателей при проведении анализа используется стандартный образец соответствующей чистоты и подходящий по составу с исследуемому белку.

Расчеты. Концентрацию белка рассчитывают путем деления содержания азота в испытуемом образце на известное содержание азота в исследуемом белке. Известное содержание азота в белке можно определить исходя из химического состава белка или путем сравнения с подходящим стандартным образцом.

Нитритометрия	**ОФС.1.2.3.0013.15** **Взамен ГФ X** **Взамен ст. ГФ XI, вып. 1** **Взамен ГФ XII, ч.1, ОФС 42-0054-07**

Нитритометрия – метод титриметрического анализа, при котором в качестве титрованного раствора используется раствор натрия нитрита.

Применяется для количественного определения соединений, содержащих первичную или вторичную ароматическую аминогруппу, для определения гидразидов, а также ароматических нитросоединений после предварительного восстановления нитрогруппы до аминогруппы.

Методика. Если не указано иначе, точную навеску образца лекарственного средства, указанную в фармакопейной статье, растворяют в смеси 10 мл воды и 10 мл хлористоводородной кислоты разведенной 8,3 %. Прибавляют воду до общего объема 80 мл, 1 г калия бромида и при постоянном перемешивании титруют натрия нитрита раствором 0,1 М. В начале титрования прибавляют раствор натрия нитрита со скоростью 2 мл/мин, а в конце (за 0,5 мл до эквивалентного количества) – 0,05 мл/мин.

Титрование проводят при температуре раствора 15 – 20 ºС, однако в некоторых случаях требуется охлаждение до 0 – 5 ºС.

При потенциометрическом титровании в качестве индикаторного применяют платиновый электрод, в качестве электродов сравнения используют хлорсеребряный или насыщенный каломельный электрод.

При амперометрическом титровании на электроды накладывают

разность потенциалов 0,3 – 0,4 В, если не указано иначе в фармакопейной статье.

Точку эквивалентности определяют электрометрическими методами (потенциометрическое титрование, титрование «до полного прекращения тока») или с помощью внутренних индикаторов и внешнего индикатора (йодкрахмальная бумага).

В качестве внутренних индикаторов используют тропеолин ОО (4 капли раствора), тропеолин ОО в смеси с метиленовым синим (4 капли раствора тропеолина ОО и две капли раствора метиленового синего), нейтральный красный (две капли в начале и две капли в конце титрования).

Титрование с тропеолином ОО проводят до перехода окраски от красной к желтой, со смесью тропеолина ОО с метиленовым синим – от красно-фиолетовой к голубой, с нейтральным красным – от красно-фиолетовой к синей. Выдержку в конце титрования с нейтральным красным увеличивают до 2 мин.

Титрование с йодкрахмальной бумагой ведут до тех пор, пока капля титруемого раствора, взятая через 1 мин после прибавления натрия нитрита раствора 0,1 М, не будет немедленно вызывать синее окрашивание на бумаге. В некоторых случаях выдержка может быть увеличена, о чем должно быть указано в фармакопейной статье.

Параллельно проводят контрольный опыт.

Кислотно-основное титрование в неводных средах	**ОФС.1.2.3.0014.15** **Взамен ГФ X** **Взамен ст. ГФ XI, вып. 1**

Метод кислотно-основного титрования в неводных растворителях применяется для количественного определения веществ, титрование которых в воде затруднено или невозможно из-за их слабовыраженных в этой среде кислотно-основных свойств, малой растворимости, наличия в объектах анализа компонентов или примесей, полностью блокирующих возможность или нарушающих селективность титрования в водной среде.

В неводных средах кислотно-основные свойства различных веществ в сравнении с наблюдаемыми в воде могут сильно изменяться, причем эти изменения для различных классов веществ индивидуальны, что позволяет путем адекватного выбора среды обеспечивать не только самую возможность титрования, но и контролировать его селективность. Выбор среды позволяет регулировать кислотно-основные свойства веществ в растворах с целью создания оптимальных условий титрования.

Выбор растворителя при наличии необходимых литературных данных может осуществляться на основании величин констант титрования ($K_т$) или их показателей (р$K_т$). Эти величины позволяют прогнозировать не только возможность, но и точность титрования. Чем меньше величина $K_т$ или больше величина р$K_т$, тем выше вероятность оптимизации условий титрования. Константа титрования определяется как частное от деления ионного произведения растворителя (K_i) на константу диссоциации растворенного вещества (K_A – для кислот, K_B – для оснований).

При титровании кислот:

$$K_T = K_i \cdot K_A^{-1}, \text{ т. е. } pK_T = pK_i - pK_A.$$

При титровании оснований:

$$K_T = K_A = K_i \cdot K_B^{-1}, \text{ т. е. } pK_T = pK_A = pK_i - pK_B.$$

При дифференцированном титровании смесей двух кислот или двух оснований:

$$K_T = K_{AII} \cdot K_{AI}^{-1} \text{ или } K_T = K_{AI} \cdot K_{AII}^{-1},$$

где индексы I и II обозначают последовательность нейтрализации.

Значения величин ионных произведений для ряда растворителей и константы диссоциации некоторых кислот и оснований в воде и в различных растворителях приведены в приложении (табл. 1, 2 и 3).

Для соединений, принадлежащих к одному классу, часто имеет место линейная зависимость между значениями pK_A в воде и неводном растворителе. Если эта зависимость изучена, ее можно использовать для предварительной оценки условий титрования в данном растворителе.

Оптимальные условия титрования для слабых кислот достигаются в основных растворителях, таких как пиридин, диметилформамид; а для слабых оснований – в кислых растворителях, таких как уксусная кислота, пропионовая кислота и уксусный ангидрид и, иногда, в нитрометане.

Соли некоторых органических и минеральных кислот могут быть оттитрованы как основания в кислых растворителях и, реже, как кислоты в основных растворителях.

Для раздельного титрования смесей кислот или оснований используют дифференцирующие растворители, т. е. растворители с величиной pK_i, обычно превышающей 15, не обладающие выраженными кислотно-основными свойствами, такие как кетоны, нитрилы, нитрометан.

В ряде случаев для титрования применяют смеси неводных растворителей, один из которых является апротонным (бензол, хлороформ и др.). Присутствие апротонного растворителя уменьшает ионное

произведение среды (K_i), что иногда способствует улучшению условий титрования.

При предварительном выборе условий кислотно-основного титрования конкретных веществ в неводных средах полезно руководствоваться таблицей.

Таблица – Растворители, индикаторы и титранты, рекомендуемые при кислотно-основном титровании в неводных средах

Растворители	Индикаторы	Титранты
Кислые Уксусная, пропионовая, муравьиная кислоты, уксусный ангидрид и их смеси с другими растворителями	Кристаллический фиолетовый, судан III, тропеолин ОО, метиловый фиолетовый, нейтральный красный, малахитовый зеленый, диметиловый желтый	Раствор хлорной кислоты в уксусной кислоте или нитрометане
Основные Диметилформамид, пиридин, этилендиамин	Тимоловый синий, бромтимоловый синий, нафтолбензеин, нитроанилин	Растворы гидроксидов натрия и калия, натрия метилата, лития метилата, гидроксиды тетраэтил- и тетрабутиламмония в спирте метиловом или в его смеси с бензолом или толуолом
Дифференцирующие Ацетон, диоксан, нитрометан, метилэтилкетон, метанол, 2-пропанол, 2-метил-2-пропанол, диметилсульфоксид	Метиловый оранжевый, тимоловый синий, нейтральный красный, метиловый красный, бромтимоловый синий	Растворы хлористоводородной кислоты в спирте метиловом или в гликолевых смесях; растворы хлорной кислоты в нитрометане, метаноле или в гликолевых смесях; растворы, применяемые при титровании в основных растворителях

Как кислоты можно титровать: фенолы, барбитураты, сульфамиды,

аминокислоты, соли и другие соединения, способные к количественному депротонированию в основных растворителях.

Как основания можно титровать: амины, азотсодержащие гетероциклические соединения, амиды, соли и другие соединения, способные к протонированию в кислых растворителях.

В ряде случаев титрование возможно только в результате взаимодействия титруемого соединения со вспомогательным реактивом перед титрованием или в процессе титрования. В частности, при титровании как оснований солей галогеноводородных кислот (титрант – 0,1 М раствор хлорной кислоты), в титруемый раствор прибавляют в избытке ртути(II) ацетат, что приводит к образованию недиссоциирующих комплексных галогенидов ртути и эквивалентного количества легко и количественно протонирующихся ацетат-ионов. В среде уксусного ангидрида титруют как основания тем же титрантом соли хлористоводородной кислоты без использования ртути(II) ацетата, поскольку в этой среде в отсутствие воды количественно протонируются непосредственно хлорид-ионы, что в обычных растворителях неосуществимо.

Возможно титрование как оснований соединений, содержащих в молекуле азиридиновые или оксирановые циклы. Для его реализации необходимо присутствие в титруемом растворе избытка нуклеофилов – бромид- или йодид-анионов. Тогда при титровании в среде кислых растворителей или нитрометана (титрант – 0,1 М раствор хлорной кислоты) количественно и быстро происходит раскрытие азиридиновых или оксирановых циклов с присоединением протона и аниона-нуклеофила. Таким образом, соединения, содержащие эти циклы, титруются как основания, но процесс практически необратим, поскольку не приводит к образованию катионов определяемых соединений.

Титрование в неводных средах может быть проведено как с индикаторами, так и потенциометрически с использованием в качестве индикаторного стеклянного или любого другого электрода, обратимого по

отношению к протону. В качестве электрода сравнения обычно применяют либо хлорсеребряный, либо каломельный электрод. При проведении потенциометрического титрования целесообразно использовать электролитический мост, заполненный насыщенным раствором калия хлорида или лития перхлората в метаноле. Это предотвращает попадание воды в титруемый раствор и возрастание электрического сопротивления моста в процессе титрования. Использование лития перхлората, как контактного электролита, необходимо, если титрование оснований проводят в протогенной среде в присутствии ртути(II) ацетата или уксусного ангидрида, то есть когда попадание в титруемый раствор даже следов калия хлорида недопустимо.

При титровании в основных растворителях следует принимать меры для защиты титруемого раствора и особенно титранта от углекислого газа, содержащегося в воздухе. Титрование в этилендиамине и пиридине лучше проводить в атмосфере инертного газа (азота или аргона).

Оптимальный объем титруемого раствора составляет от 30 до 50 мл, целесообразная величина расхода титранта в пределах от 5 до 9 мл.

В ряде случаев, особенно при меняющемся в процессе титрования составе среды и при инструментальной индикации точки эквивалентности, проведение контрольного опыта обычным путем неосуществимо. В таком случае проводят титрование двух разных навесок определяемого вещества. Величина разности расходов титранта на эти навески не должна быть меньше 5 мл. Расчет результата определения ведется по величине этой разности, отнесенной к разности навесок, что исключает ошибку, связанную с нецелевым расходом титранта, практически одинаковую при титровании каждой из навесок.

Приложение

Табл. 1 – Величины pK_i различных растворителей ($pK_i = -\lg K_i$) при температуре от 20 до 25 °С

№ п/п	Растворитель	pK_i
1	Серная кислота	3,62
2	Муравьиная кислота	6,1
3	Уксусная кислота	14,4
4	Уксусный ангидрид	14,5
5	Этилендиамин	15,3
6	Этиленгликоль	15,6
7	Формамид	16,7
8	Метанол	16,7
9	Пропиленгликоль	16,8
10	Диэтиленгликоль	17,5
11	Этанол	19,1
12	*н*-Бутанол	20,1
13	Метилцеллозольв	20,7
14	Изопропанол	22,0
15	Диметилацетамид	23,9
16	Нитрометан	24,0
17	*N*-Метилпирролидон	24,2
18	Пиридин	24,2
19	Диметилформамид	25,3
20	Метилбутилкетон	25,3
21	Метилэтилкетон	25,7
22	Ацетон	25,9
23	Ацетонитрил	32,2
24	Диметилсульфоксид	33,3

Табл. 2 – Величины pK_A кислот в различных растворителях (p$K_A = -\lg K_A$)

Кислота	**Растворитель**																				
	Вода	Метанол	Спирт 95 %	Бутанол	Изопропанол	Этиленгликоль	Пропиленгликоль	Метилцеллозольв	Ацетон	Метилизобутилкетон	Метилэтилкетон	Формамид	Диметилформамид	Диметилсульфоксид	Ацетонитрил	Нитрометан	N-метилпирролидон	Пиридин	Уксусная кислота	Муравьиная кислота	Уксусный ангидрид
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
Азотная	0,2	3,17	3,75								4,66					8,80		4,30	5,10		8,20
Ацетилсалициловая	3,50										16,30		11,30								
Барбитуровая	4,01																	6,67			
Бензойная	4,20	9,52	10,13	10,24		8,16	8,83	10,70	11,95		16,6	6,36	12,20	11,10	20,70	19,60	12,30	9,80			
Винная	3,03	7,40											8,90								
Дихлоруксусная	1,31	6,30	7,14	7,30	7,80	4,50			10,20		10,26				15,80	14,10	8,30				
Лимонная	3,10										10,1		10,60								
Монохлоруксусная	2,86	7,80	8,51	8,50	9,23	6,05		9,10	11,20		15,4	4,50	10,10	8,90	18,80	17,0	10,90				
Муравьиная	3,75		9,15					9,70			16,70	5,74	11,55				12,0	8,84			

Продолжение табл. 2

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
Никотиновая	4,73								16,60		15,0		10,80	9,60							
п-Аминобензойная	4,92																				
Пикриновая	0,80	4,80	3,93	4,50	3,70				3,17	11,0	3,70	1,33	3,65	1,0	11,0	10,50		3,65			
п-Нитробензойная	3,40	8,40	8,87	9,10	9,60				10,59			5,88	10,60	9,0	18,70	17,60	10,50	7,94			
п-Толуолсульфоновая													1,55		5,30			2,68		0,34	
Салициловая	2,89	7,90	8,60	7,73				8,90	9,53		13,0	4,73	8,30	6,80	16,70						
Серная		1,44		3,42							5,48		3,10		4,60	5,10			4,25	0,58	4,90
Сульфадимезин	7,51								19,60		18,70		13,0								
Сульфадиметоксин	5,90																				
Трихлоруксусная	0,70	4,90	5,70	6,30				5,90	8,20		8,86	1,46	10,60								
Уксусная	4,75	9,70	10,41	10,35	11,35	8,32	9,10	11,10	12,55		16,6	6,91	13,50	12,60	22,30	20,50	13,30	11,44			
Фенилуксусная	4,31					8,06	8,78					6,57	12,90	11,60		20,10					
Фенобарбитал	7,21								19,20		13,30		13,40	10,98							
Хлористоводородная	0,8	1,05	1,95		3,10				8,90		8,30				6,20	8,10	4,08	5,40	5,30	0,89	8,30
Хлорная									2,90		2,20				1,90	2,23		3,23	2,70	0,28	0,90

Табл. 3 – Величины pK_A оснований в различных растворителях (pK_A = pK_i − pK_B = pK_T)

Основание	**Растворитель**																	
	Вода	Метанол	Спирт 95%	Этиленгликоль	Пропиленгликоль	Метилцеллозольв	N-метилпирролидон	Муравьиная кислота	Уксусная кислота	Уксусный ангидрид	Ацетон	Метилэтилкетон	Метилизобутилкетон	Формамид	Диметилформамид	Диметилсульфоксид	Нитрометан	Ацетонитрил
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Аденин	9,90					13,70												
Аммиак	9,30					11,70			10,10						9,45	10,50	15,70	16,46
Анилин	4,58	6,10	5,70	6,12	6,12			5,49	8,60		5,92		9,63	4,10	4,36	3,60	9,07	10,56
Ацетамид	0,48								6,75	8,60					9,50			
Ацетанилид	0,40								6,80	7,30								
Бензиламин	9,62					11,30												
Гидразин	8,11					11,10												
Гуанозин	12,40					15,0												

Продолжение табл. 3

Дибазол	4,20									9,00					6,40			
Димедрол	8,20														7,70			
Диметиламин	10,60								10,0						10,40		17,96	18,73
Диметиланилин	5,10	4,50	4,40						9,93		4,91	6,20				2,51	11,04	
Дифениламин	0,90	3,18							7,45		3,87						5,24	
Диэтиламин	10,90					12,20	9,20	5,19	10,10			13,44			10,10	10,50	17,95	18,70
Диэтиланилин	6,52								10,20	10,60	6,26	7,20						
Кодеин	8,00	8,60	11,40	9,38				5,11		10,80	9,62	11,18			8,30			
Кофеин	0,60							5,17		6,30								
Мочевина	0,20							4,67	7,65	9,36								
α-Нафтиламин	3,92	5,66	5,10					5,05	9,60		5,42	6,38						
Новокаин	8,80									11,30					8,60			
Папаверин	5,90	6,92		7,25						10,80	8,03				6,60			
Пилокарпин	6,80									10,90								
Пиперидин	11,20	11,0	12,51	12,52	11.71		10,40		10,1		12,24	13,48		11,08	10,40		18,22	18,92
Пиридин	5,15	5,54	4,30	5,92	5.69			5,50	10,0	9,90	5,77	6,94		4,43	3,30	3,40	12,16	19,33
Промедол	8,40									11,30		14,40			8,20			

Продолжение табл. 3

Теобромин	0,10							5,26		6,10								
Теофиллин	2,60									6,60								
Трибутиламин	9,85								10,10								17,77	18,10
Триэтиламин	10,70			11,15	10,87		8,70		10,20	11,50	11,62	12,40		9,99	9,25	9,0	18,35	18,46
Цитидин	9,80					13,20												
Эфедрин	9,70			11,29						8,90								

Комплексонометрическое титрование	**ОФС.1.2.3.0015.15** **Взамен ГФ X** **Взамен ст. ГФ XI, вып. 1**

Комплексонометрическое титрование – метод титриметрического анализа, основанный на реакции комплексообразования катионов металлов с комплексонами – аминополикарбоновыми кислотами и их солями.

В настоящее время среди известных комплексонов наибольшее применение для комплексонометрического титрования получила динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты, известная под названиями: натрия эдетат, трилон Б, комплексон III, хелатон III и др.

Натрия эдетат образует с катионами различных металлов в стехиометрическом отношении (1:1) устойчивые и хорошо растворимые в воде комплексонаты, что позволяет использовать его для количественного определения алюминия, висмута, кальция, магния, свинца, цинка и других ионов металлов в лекарственных препаратах.

Индикаторы, применяемые для визуального определения конечной точки титрования, называются металлоиндикаторами. В химическом отношении они, как правило, являются органическими кислотами и обладают способностью изменять окраску при образовании комплексных соединений с катионами металлов. Взаимодействие металлоиндикаторов с катионами определяемых металлов должно быть обратимым и константа устойчивости металлоиндикаторного комплекса должна быть на 10^4 меньше константы устойчивости комплекса катиона металла с титрантом.

Прямое титрование раствором натрия эдетата проводят следующим образом: к раствору анализируемого катиона прибавляют буферный раствор, имеющий необходимое значение pH, и указанное количество металлоиндикатора. В точке эквивалентности окраска раствора изменяется от окраски комплекса катиона с металлоиндикатором до окраски свободного металлоиндикатора.

При обратном титровании избыток натрия эдетата оттитровывают при определенном значении pH в присутствии соответствующего металлоиндикатора растворами солей магния, свинца, цинка и др. до перехода окраски свободного индикатора до окраски комплекса металлоиндикатора с катионом титранта.

Методики определения катионов

Алюминий. Определение проводят одним из приведенных ниже способов.

1. Точную навеску препарата (соответствующую 0,02 – 0,03 г алюминия) растворяют в смеси 2 мл хлористоводородной кислоты раствора 1 М и 50 мл воды. Прибавляют 50,0 мл натрия эдетата раствора 0,05 М и нейтрализуют натрия гидроксида раствором 1 М по метиловому красному. Нагревают раствор до кипения и выдерживают на кипящей водяной бане в течение 10 мин, охлаждают, прибавляют 0,05 г индикаторной смеси ксиленолового оранжевого, 5 г гексаметилентетрамина и титруют избыток натрия эдетата цинка сульфата раствором 0,1 М до красно-фиолетового окрашивания.

1 мл натрия эдетата раствора 0,05 М соответствует 1,349 мг алюминия.

2. К 20,0 мл раствора препарата, приготовленного, как описано в фармакопейной статье, прибавляют 25,0 мл натрия эдетата раствора 0,1 М и 10 мл смеси равных объемов аммония ацетата раствора 15,5 % и уксусной кислоты разведенной 12 %. Кипятят в течение 2 мин, охлаждают до комнатной температуры, прибавляют 50 мл этанола и 3 мл свежеприготовленного дитизона раствора 0,025 % в этаноле. Избыток натрия

эдетата оттитровывают цинка сульфата раствором 0,1 М до перехода окраски от зеленовато-голубой до красно-фиолетовой.

1 мл натрия эдетата раствора 0,1 М соответствует 2,698 мг алюминия.

Висмут. Точную навеску препарата (соответствующую 0,1 – 0,2 г висмута) растворяют, как указано в фармакопейной статье. Прибавляют 50 мл воды и доводят pH до 1,0 – 2,0, добавляя по каплям азотную кислоту разведенную 16 % или 10 % раствор аммиака. Прибавляют 0,05 г индикаторной смеси ксиленолового оранжевого и медленно титруют натрия эдетата раствором 0,05 М до желтого окрашивания.

1 мл натрия эдетата раствора 0,05 М соответствует 10,45 мг висмута.

Кальций. Точную навеску препарата (соответствующую 0,04 – 0,05 г кальция) растворяют, как указано в фармакопейной статье, в воде или хлористоводородной кислоте разведенной 8,3 % и далее проводят определение по одному из приведенных способов:

1. Доводят объем раствора водой до 100 мл и титруют натрия эдетата раствором 0,05 М. В конце титрования прибавляют 4 мл натрия гидроксида раствора 30 % и 3 мл раствора хальконкарбоновой кислоты – появляется розовое окрашивание. Продолжают титрование до перехода окраски в интенсивно синий цвет.

2. Доводят объем раствора водой до 50 мл, прибавляют 10 мл буферного раствора аммония хлорида pH 10,0; 0,1 г индикаторной смеси или 7 капель раствора индикатора хромового темно-синего и титруют натрия эдетата раствором 0,05 М до сине-фиолетового окрашивания.

1 мл натрия эдетата раствора 0,05 М соответствует 2,004 мг кальция.

Магний. Точную навеску препарата (соответствующую 0,02 – 0,03 г магния) растворяют, как указано в фармакопейной статье. Прибавляют 50 мл воды, 10 мл буферного раствора аммония хлорида pH 10,0; 0,1 г индикаторной смеси или 7 капель раствора индикатора кислотного хром черного специального и титруют натрия эдетата 0,05 М раствором до синего окрашивания.

1 мл натрия эдетата раствора 0,05 М соответствует 1,215 мг магния.

Свинец. Точную навеску препарата (соответствующую 0,1 – 0,2 г свинца) растворяют, как указано в фармакопейной статье. Прибавляют 50 мл воды, 0,05 г индикаторной смеси ксиленолового оранжевого, 5,0 г гексаметилентетрамина и титруют натрия эдетата раствором 0,05 М до желтого окрашивания.

1 мл натрия эдетата 0,05 М раствора соответствует 10,36 мг свинца.

Цинк. Точную навеску препарата (соответствующую 0,06 – 0,08 г цинка) растворяют, как указано в фармакопейной статье. Прибавляют 50 мл воды, 0,05 г индикаторной смеси ксиленолового оранжевого, 5,0 г гексаметилентетрамина и титруют натрия эдетата раствором 0,05 М до желтого окрашивания.

1 мл натрия эдетата раствора 0,05 М соответствует 3,269 мг цинка.

Определение кислотонейтрализующей способности	**ОФС.1.2.3.0016.15** **Вводится впервые**

Показатель «Кислотонейтрализующая способность» характеризует основные свойства препаратов-антацидов – способность связывать хлористоводородную кислоту. Кислотонейтрализующая способность выражается количеством миллиграмм-эквивалентов хлористоводородной кислоты, связываемой 1 г или минимальной дозой препарата.

Приготовление испытуемого раствора

Если не указано иначе, испытуемый раствор готовят следующим образом:

Твердые лекарственные формы. Точно взвешенное количество препарата, эквивалентное минимальной дозе, помещают в стакан вместимостью 250 мл. При необходимости увлажняют, прибавляя не более 5 мл спирта 96 % (нейтрализованного до pH 3,5) и перемешивают, чтобы смочить образец полностью. Прибавляют 70 мл воды и перемешивают на магнитной мешалке в течение 1мин.

Примечание. В случае шипучих таблеток к навеске сначала прибавляют 10 мл воды и осторожно вращают стакан, пока реакция не прекратится. Добавляют еще 10 мл воды и осторожно перемешивают. Обмывают стенки стакана 50 мл воды и перемешивают на магнитной мешалке в течение 1 мин.

Суспензии и другие жидкости. Встряхивают контейнер, пока содержимое не станет однородным, и определяют плотность. Переносят точно взвешенное количество однородной смеси, эквивалентное

минимальной дозе, в стакан вместимостью 250 мл, добавляют воду до объема приблизительно 70 мл и перемешивают на магнитной мешалке в течение 1 мин.

Методика

К испытуемому раствору при перемешивании магнитной мешалкой прибавляют 30,0 мл 1М титрованного раствора хлористоводородной кислоты. Перемешивают в течение 15 мин, и в течение не более 5 мин оттитровывают избыток хлористоводородной кислоты 0,5 М раствором натрия гидроксида до достижения устойчивого от 10 до 15 с значения pH 3,5.

Вычисляют количество миллиграмм-эквивалентов (мг-экв) поглощенной кислоты по формуле:

$$\text{мг-экв} = (30 \cdot M_{HCl}) - (V_{Na0H} \cdot M_{Na0H}), \quad (1)$$

где M_{HCl} и M_{Na0H} – молярность хлористоводородной кислоты и натрия гидроксида соответственно;

V_{Na0H} – объем натрия гидроксида раствора 0,5 М, израсходованный на титрование.

Примечание. Если кислотонейтрализующая способность анализируемого образца больше 25 мг-экв, добавляют 60,0 мл 1 М титрованного раствора хлористоводородной кислоты и делают соответствующее изменение при вычислении.

Выражают результат в миллиграмм-эквивалентах (мг-экв) кислоты, поглощенной 1 г испытуемого препарата (X_1) или минимальной дозой (X_2):

Для твердых лекарственных форм:

$$X_1 = \frac{\text{мг-экв}}{a}, \quad (2) \qquad X_2 = \frac{\text{мг-экв} \cdot G}{a}, \quad (3)$$

где a – навеска препарата, г;
G – средняя масса таблетки или содержимого капсулы, г.

Для жидкостей:

$$X_2 = \frac{\text{мг-экв} \cdot V_{\text{дозы}} \cdot \rho}{a}, \quad (4)$$

где $V_{\text{дозы}}$ – объем дозы, мл;
ρ – плотность жидкости, г/мл;
a – навеска препарата, г.

Методы количественного определения витаминов	**ОФС.1.2.3.0017.15** **Взамен ст. ГФ XI, вып.2**

В данной статье изложены общие принципы определения витаминов в субстанциях и лекарственных формах с использованием методов высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), спектрофотометрии и титриметрии.

Приведенные типовые методики позволяют количественно определять следующие соединения: витамин А (ретинол, ретинола ацетат и ретинола пальмитат), витамин D (холекальциферол и эргокальциферол), витамин Е (α-токоферол и α-токоферола ацетат), витамин $К_1$ (фитоменадион), β-каротин, витамины $В_1$ (тиамина хлорид, тиамина бромид и тиамина мононитрат), $В_2$ (рибофлавин, рибофлавинмононуклеотид), $В_3$ (кислоту никотиновую, никотинамид), $В_5$ (кислоту пантотеновую и ее соли, пантенол), $В_6$ (пиридоксина гидрохлорид), $В_С$ (кислоту фолиевую), $В_{12}$ (цианокобаламин), витамин С (кислоту аскорбиновую или ее натриевую или кальциевую соли, аскорбилпальмитат), *d*-биотин, рутин.

Оборудование

В соответствии с ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография», «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях».

Рекомендуемые условия. Колонка длиной 250 мм, диаметром 4,6 мм с октадецилсилилсиликагелем с размером частиц 5 мкм. Объем вводимой пробы 20 мкл. Скорость потока подвижной фазы 1,0 мл/мин.

Допускается использование колонок других размеров с той же или большей эффективностью, а также других объемов введения и скоростей потока подвижной фазы при условии пригодности хроматографической системы.

Параметры пригодности хроматографической системы. Разрешение между двумя соседними пиками должно быть не менее 1,5.

Факторы асимметрии пиков должны быть близки к единице, в предельном случае не менее 0,8 и не более 2.

Проведение расчетов. Содержание витамина в анализируемой субстанции в процентах (X_1) или в анализируемом препарате в миллиграммах (X_2) вычисляют по формулам:

$$X_1 = \frac{S \cdot a_0 \cdot N \cdot P}{S_0 \cdot a \cdot N_0},$$

$$X_2 = \frac{S \cdot a_0 \cdot N \cdot G \cdot P}{S_0 \cdot a \cdot N_0 \cdot 100},$$

где: S и S_0 – площади пиков определяемого витамина на хроматограммах испытуемого и стандартного растворов соответственно;

a – навеска испытуемого препарата или субстанции, г;

a_0 – навеска стандартного образца, г;

N и N_0 – разведения при приготовлении испытуемого и стандартного растворов соответственно;

G – среднее значение массы единицы лекарственной формы, мг;

P – содержание основного вещества в стандартном образце, %.

Определение жирорастворимых витаминов

1. *Определение витаминов A, D и E в препаратах*

Подвижная фаза: метанол – ацетонитрил (80:20).

Рекомендуемые концентрации витаминов в стандартном и испытуемом растворах:

Витамин А – от 0,5 до 3,5 мкг/мл;

Витамин D – от 2,0 до 10,0 мкг/мл;

Витамин Е – от 1,0 до 5,0 мг/мл.

Приготовление стандартных растворов. В зависимости от состава анализируемого препарата готовят стандартный раствор витаминов, содержащихся в этом препарате. Количества стандартных образцов ретинола ацетата, холекальциферола (или эргокальциферола) и α-токоферола ацетата (точные навески), примерно эквивалентные количеству этих витаминов, содержащихся в 1 таблетке (капсуле, дозе сиропа, геля или раствора), помещают в круглодонную колбу вместимостью 250 мл. Туда же помещают кислоту аскорбиновую в количестве примерно 10:1 по отношению к навеске α-токоферола ацетата в качестве антиоксиданта. В колбу добавляют 15 мл воды и нагревают на водяной бане при 60 °С в течение 5 мин. Затем добавляют 25 мл спирта 96 % и 8 мл калия гидроксида раствора 50 % и нагревают на водяной бане с обратным холодильником при 60 °С в течение 30 мин. Полученную смесь охлаждают и экстрагируют гексаном (3 раза по 50 мл). Объединенные гексановые экстракты промывают водой до нейтральной реакции водного слоя по универсальной индикаторной бумаге и упаривают на роторном испарителе в колбе соответствующего объёма при температуре не выше 60 °С. Остаток после упаривания растворяют в 25,0 мл подвижной фазы. При необходимости используют другое разведение для получения приемлемых для конкретных условий анализа концентраций витаминов.

При анализе субстанций готовят стандартные растворы с концентрацией определяемых витаминов в указанных выше пределах.

Приготовление испытуемого раствора. Растирают 10 таблеток (содержимое 10 капсул) и отбирают точную навеску порошка, примерно равную массе одной таблетки или содержимого одной капсулы. При анализе жидких или гелеобразных образцов берут точную навеску, примерно равную массе одной дозы препарата. Навеску порошка (жидкого или гелеобразного образца) помещают в круглодонную колбу вместимостью 250 мл. Если в испытуемом образце содержится *α*-токоферола ацетат, но отсутствует

аскорбиновая кислота, туда же помещают аскорбиновую кислоту в количестве примерно 10:1 по отношению к навеске α-токоферола ацетата.

К навеске добавляют 15 мл воды и нагревают на водяной бане при 60 °С в течение 5 мин. Затем прибавляют 25 мл спирта 96 % и 8 мл калия гидроксида раствора 50 % и нагревают на водяной бане с обратным холодильником при температуре 60 °С в течение 30 мин. Полученную смесь охлаждают и экстрагируют гексаном (3 раза по 50 мл). Объединенные гексановые экстракты промывают водой до нейтральной реакции и упаривают на роторном испарителе в колбе соответствующего объёма при температуре не выше 60 °С. Остаток после упаривания растворяют в 25,0 мл подвижной фазы. При необходимости используют другое разведение для получения приемлемых в конкретных условиях анализа концентраций витаминов.

При анализе субстанций готовят испытуемые растворы с концентрацией определяемых витаминов в указанных выше пределах.

При анализе масляных растворов приготовление испытуемого раствора проводят аналогичным образом с той только разницей, что воду (10 мл) добавляют через обратный холодильник не до, а после омыления, т. е. после нагревания смеси на водяной бане при температуре 60 °С.

Проведение анализа. Последовательно хроматографируют стандартный и испытуемый растворы. Операцию повторяют не менее двух раз.

Условия детектирования определяются составом анализируемого препарата и используемым оборудованием.

Определение каждого витамина можно проводить отдельно, детектируя витамин А при 326 нм, витамин Е при 292 нм и витамин D при 265 нм. Возможно также одновременно определять витамины А и Е, проводя детектирование при длине волны 300 нм.

Относительное время удерживания (по пику витамина Е): витамин А – около 0,35, витамин D – около 0,87.

2. *Определение витаминов А и Е в масляных растворах, не содержащих витамин D*

Количество препарата, соответствующее примерно 0,2 дозы (точная навеска), помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, добавляют 1 мл метиленхлорида, доводят объем раствора метанолом до метки и перемешивают. Полученный раствор анализируют, как указано в разделе «Определение жирорастворимых витаминов» (пункт 1, «Проведение анализа»).

3. *Спектрофотометрическое определение ретинола ацетата и ретинола пальмитата в масляных растворах*

Точную навеску препарата, указанную в фармакопейной статье (эквивалентную примерно 9 мг ретинола ацетата или 14 мг ретинола пальмитата), помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в изопропиловом спирте, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают. Полученный раствор разбавляют изопропиловым спиртом до получения раствора с концентрацией 3,0 – 3,5 мкг/мл для ретинола ацетата и 5,0 – 5,5 мкг/мл для ретинола пальмитата.

Измеряют оптическую плотность полученного раствора на спектрофотометре при длинах волн 300, 326, 350 и 370 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют изопропиловый спирт.

Вычисляют отношения значений оптической плотности при 300, 350 и 370 нм к значению оптической плотности при 326 нм. Отношения не должны превышать 0,608 при 300 нм, 0,553 при 350 нм и 0,142 при 370 нм.

При выполнении этого условия содержание ретинола ацетата или пальмитата *(X)* в 1 мл препарата в граммах вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot \rho \cdot N}{100 \cdot A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a},$$

где: A – оптическая плотность испытуемого раствора при длине волны 326 нм;

N – разведение;

ρ – плотность препарата, г/см^3;

a – навеска препарата, г;

$A_{1\text{см}}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения при длине волны 326 нм (1530 для *транс*-ретинола ацетата или 975 для *транс*-ретинола пальмитата в спирте изопропиловом).

Если указанное условие не выполняется, количественное определение необходимо проводить методом ВЭЖХ (раздел «Определение жирорастворимых витаминов», п. 1).

Примечания.

1. 1,0 г *транс*-ретинола ацетата соответствует 2907000 МЕ витамина А. 1,0 г *транс*-ретинола пальмитата соответствует 1817000 МЕ витамина А.

2. Изопропиловый спирт (2-пропанол) при измерении относительно воды в кювете с толщиной слоя 10 мм должен иметь величину оптической плотности, не превышающую 0,01 в области от 320 до 350 нм и 0,05 в области от 280 до 300 нм.

4. *Определение витамина K_1 (фитоменадиона)*

Приготовление стандартного раствора. Около 0,06 г (точная навеска) стандартного образца фитоменадиона помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, добавляют 10 мл метанола и после растворения доводят объем до метки тем же растворителем. 1,0 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора метанолом до метки и перемешивают.

Приготовление испытуемого раствора. Навеску измельченного препарата (или аналогичное по содержанию определяемого витамина количество жидкого препарата), соответствующую примерно 60 мкг фитоменадиона, помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, добавляют 15 мл метанола, выдерживают в течение 5 мин при температуре 60 °С, быстро охлаждают до комнатной температуры, доводят объем раствора метанолом до метки и перемешивают. При необходимости фильтруют через фильтр с размером пор 0,5 мкм.

При анализе субстанции витамина $К_1$ испытуемый раствор готовят так же, как стандартный раствор.

Проведение анализа. Подвижная фаза: метанол – метиленхлорид (92:8). Скорость элюирования 1 мл/мин. Последовательно хроматографируют стандартный и испытуемый растворы в тех же условиях, что и витамины А, D и Е (см. п. 2.1). Детектирование при 248 нм.

5. *Определение β-каротина*

Содержание β-каротина в анализируемом препарате определяют спектрофотометрически после его экстракции.

Количество препарата, соответствующее примерно 300 мкг β-каротина (точная навеска), экстрагируют 10 мл диметилсульфоксида при встряхивании в течение 10 мин и выдерживают на водяной бане в течение 15 мин при температуре 55 °С. Быстро охлаждают до комнатной температуры, переносят в цилиндр с притертой пробкой, прибавляют 25 мл гексана, 3 мл воды и встряхивают в течение 2 – 3 мин. После разделения слоев 3,0 мл верхнего (гексанового) слоя переносят в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят объем раствора гексаном до метки и перемешивают. Измеряют оптическую плотность полученного раствора в максимуме поглощения при длине волны 450 нм относительно гексана.

Содержание β-каротина *(X)* в МЕ вычисляют по формуле:

$$X = \frac{1650000 \cdot A \cdot N \cdot G}{100 \cdot a \cdot A_{1см}^{1\%}} = \frac{16500 \cdot A \cdot N \cdot G}{2592 \cdot a},$$

где: A – оптическая плотность испытуемого раствора;

N – разведение испытуемого раствора;

G – средняя масса единицы лекарственной формы, г;

a – навеска испытуемого препарата, г;

1650000 – активность 1 г β-каротина, МЕ;

$A_{1см}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения β-каротина в гексане при длине волны 450 нм, равный 2592.

Анализ концентратов и субстанции β-каротина выполняют аналогичным образом.

Определение водорастворимых витаминов

Все водорастворимые витамины (за исключением витамина С в некоторых случаях) определяют методом ВЭЖХ (см. раздел «Определение жирорастворимых витаминов», пункт 1).

1. *Определение витаминов B_1, B_2, B_3, B_6, B_C, С и рутина*

Рекомендуемые концентрации витаминов в стандартном и испытуемом растворах:

Витамин B_1 – от 5 до 15 мкг/мл;

Витамин B_2 – от 3 до 8 мкг/мл;

Витамин B_3 (никотинамид и никотиновая кислота) – от 2 до 5 мкг/мл;

Витамин B_C (фолиевая кислота) – от 3 до 8 мкг/мл;

Витамин B_6 – от 5 до 10 мкг/мл;

Витамин С – от 150 до 300 мкг/мл;

Рутин – от 100 до 200 мкг/мл.

Приготовление подвижной фазы

Раствор А. Около 0,240 г (точная навеска) натрия пентансульфоната и 5 мл уксусной кислоты ледяной растворяют в смеси метанол – вода (25:75), переносят в мерную колбу вместимостью 250 мл, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают.

Раствор Б. Около 0,275 г (точная навеска) натрия гептансульфоната и 5 мл уксусной кислоты ледяной растворяют в смеси метанол – вода (25:75), переносят в мерную колбу вместимостью 250 мл, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают.

Для получения подвижной фазы смешивают растворы А и Б в соотношении 5:3.

Приготовление стандартного раствора. В зависимости от состава анализируемого препарата готовят стандартный раствор витаминов рассматриваемой группы, содержащихся в этом препарате. Точные навески стандартных образцов витаминов B_1, B_2, B_6, никотинамида, B_c (фолиевой кислоты), С, рутина, примерно равные содержанию этих витаминов в 1 таблетке (капсуле, дозе) анализируемого препарата, помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, добавляют 20 мл подвижной фазы, нагревают в течение 20 мин на водяной бане при 60 °С, охлаждают до комнатной температуры, доводят объем раствора подвижной фазой до метки и перемешивают.

Приготовление испытуемого раствора. Растирают 10 таблеток (содержимое 10 капсул) и отбирают точную навеску порошка, примерно равную массе одной таблетки или содержимого одной капсулы. При анализе жидких или гелеобразных образцов берут точную навеску, примерно равную массе одной дозы препарата. Навеску помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл. Далее поступают, как при приготовлении стандартного раствора, начиная со слов «добавляют 20 мл подвижной фазы». При необходимости используют другое разведение для получения приемлемых для конкретных условий анализа концентраций витаминов.

Проведение анализа. Последовательно хроматографируют предварительно отфильтрованные через фильтр с размером пор 0,5 мкм стандартный и испытуемый растворы, проводя детектирование при 280 нм. Операцию повторяют не менее двух раз.

1.1. Определение рутина отдельно от других водорастворимых витаминов

Для уменьшения времени удерживания рутина используют подвижную фазу состава метанол – вода (44,5:55,5) с pH 2,4 (pH устанавливают, добавляя по каплям фосфорную кислоту разведенную 10 %. Остальные операции проводят аналогично разделу «Определение водорастворимых витаминов» (пункт 1) с той разницей, что нагревание на водяной бане при 60 °С проводят

в течение 5 мин. Время удерживания рутина около 6 мин, детектирование при длине волны 360 нм.

2. *Определение витамина B_5*

Подвижная фаза: калия дигидрофосфата 0,05 М раствор (pH 2,8) – метанол (95:5).

Приготовление стандартного раствора. Готовят раствор стандартного образца витамина B_5 (пантотеновой кислоты, пантотената кальция или пантенола) в подвижной фазе с концентрацией около 200 мкг/мл в расчете на пантотеновую кислоту.

Приготовление испытуемого раствора. Точную навеску порошка растертых таблеток (содержимого капсул, жидкого или гелеобразного препарата), эквивалентную 10 мг витамина B_5, помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, добавляют 20 мл подвижной фазы, встряхивают 2 – 3 мин, доводят объем раствора подвижной фазой до метки и перемешивают.

Перед проведением анализа стандартный и испытуемый растворы фильтруют через фильтр с размером пор 0,5 мкм.

Проведение анализа. Последовательно хроматографируют стандартный и испытуемый растворы, проводя детектирование при 205 нм. Остальные условия указаны в пункте 1. Операцию повторяют не менее двух раз. Время удерживания витамина B_5 около 8,5 мин.

3. *Определение витамина B_{12}*

Методика 1

Подвижная фаза: метанол – вода (35:65).

Приготовление стандартного раствора. Готовят раствор стандартного образца цианокобаламина в воде, имеющий концентрацию около 0,5 мкг/мл.

Приготовление испытуемого раствора. Растирают 10 таблеток (содержимое 10 капсул) и отбирают точную навеску порошка, эквивалентную примерно 10 мкг цианокобаламина (при анализе жидких или

гелеобразных образцов отбирают точный объем или берут точную навеску, в которых содержание цианокобаламина примерно равно его содержанию в одной дозе препарата). Навеску помещают в коническую колбу вместимостью 50 мл, добавляют 20,0 мл воды и энергично встряхивают в течение 2 – 3 мин. Раствор фильтруют через фильтр с размером пор 0,5 мкм, отбрасывая первые 5 мл фильтрата (в случае жидких образцов раствор тщательно перемешивают).

Проведение анализа. Инжектируемый объем не менее 50 мкл. Остальные условия указаны в пункте 1. Последовательно хроматографируют стандартный и испытуемый растворы, проводя детектирование при 550 нм. Операцию повторяют не менее 2 раз. Время удерживания витамина B_{12} около 5 мин.

Методика 2

Подвижная фаза: динатрия гидрофосфата безводного раствор 1 % (pH 3,5) – метанол (70:30).

Приготовление стандартного раствора. Готовят раствор стандартного образца цианокобаламина в воде с концентрацией около 0,5 мкг/мл.

Приготовление испытуемого раствора. Растирают 10 таблеток (содержимое 10 капсул) и отбирают точную навеску порошка, эквивалентную примерно 10 мкг цианокобаламина (при анализе жидких или гелеобразных образцов отбирают точный объем или берут точную навеску с содержанием цианокобаламина, примерно равным его содержанию в одной дозе препарата). Добавляют 20,0 мл подвижной фазы и встряхивают в течение 5 мин. Полученный раствор фильтруют через фильтр с размером пор 0,5 мкм, отбрасывая первые 5 мл фильтрата (в случае жидких образцов раствор тщательно перемешивают).

Проведение анализа. Инжектируемый объем не менее 50 мкл. Остальные условия указаны в пункте 1. Последовательно хроматографируют стандартный и испытуемый растворы, проводя детектирование при 361 нм. Операцию повторяют не менее двух раз. Время удерживания витамина B_{12} около 5 мин.

Методика 3

Определение методом спектрофотометрии. Готовят раствор препарата в воде с концентрацией 20 – 25 мкг/мл. Измеряют оптическую плотность полученного раствора на спектрофотометре в максимуме поглощения при длине волны 361 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора стандартного образца цианокобаламина.

В качестве раствора сравнения используют воду.

При анализе инъекционных растворов содержание цианокобаламина (X) в 1 мл препарата в микрограммах вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot a_0 \cdot N \cdot 10^6}{A_0 \cdot V},$$

где: A – оптическая плотность испытуемого раствора;

A_0 – оптическая плотность раствора стандартного образца цианокобаламина;

a_0 – навеска стандартного образца цианокобаламина (в пересчете на 100 % вещество), г;

N – разведение;

V – объем препарата, взятый для анализа, мл.

При анализе субстанций содержание цианокобаламина *(X)* в субстанции в процентах вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot C_0 \cdot N \cdot 100}{A_0 \cdot a},$$

где: A – оптическая плотность испытуемого раствора;

A_0 – оптическая плотность раствора стандартного образца цианокобаламина;

C_0 – концентрация раствора стандартного образца цианокобаламина (в пересчете на 100 % вещество), г/мл;

a – навеска цианокобаламина (в пересчете на 100 % вещество), г;

N – разведение испытуемой субстанции.

Примечания.

1. Приготовление раствора стандартного образца цианокобаламина.

Около 0,05 г (точная навеска) стандартного образца цианокобаламина помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 80 мл воды, взбалтывают 10 мин, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают

(раствор А). 2,0 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Срок годности раствора А при хранении в защищенном от света месте 1 мес.

2. При отсутствии стандартного образца цианокобаламина можно использовать значение удельного показателя поглощения цианокобаламина при длине волны 361 нм, равное 207.

4. *Определение d-биотина*

Приготовление подвижной фазы. К 1,0 г натрия перхлората прибавляют 75 мл ацетонитрила и 1 мл фосфорной кислоты; после растворения добавляют воду до объема 1 л и доводят значение pH до 4,5 добавлением натрия гидроксида раствора 0,1 М.

Приготовление стандартного раствора. Готовят раствор стандартного образца *d*-биотина, имеющий концентрацию около 3 мкг/мл.

Приготовление испытуемого раствора. Растирают 10 таблеток (содержимое 10 капсул) и отбирают точную навеску порошка, примерно эквивалентную 75 мкг *d*-биотина. Аналогичную навеску берут при анализе жидких или гелеобразных образцов. Навеску помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, добавляют 15 мл воды, нагревают на водяной бане при 60 °С в течение 5 мин, охлаждают до комнатной температуры, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Перед проведением анализа стандартный и испытуемый растворы фильтруют через фильтр с размером пор 0,5 мкм.

При анализе субстанции биотина испытуемый раствор готовят так же, как стандартный раствор.

Проведение анализа. Последовательно хроматографируют стандартный и испытуемый растворы на колонке 250 × 4,6 мм, заполненной октилсилилсиликагелем с размером частиц 5 мкм, проводя детектирование при 200 нм. Остальные условия указаны в п. 1. Операцию повторяют не менее трех раз. Время удерживания *d*-биотина около 20 мин.

5. *Титриметрическое определение витамина С*

Растирают 10 таблеток (содержимое 10 капсул) и отбирают точную навеску порошка, примерно эквивалентную 0,1 г аскорбиновой кислоты. При анализе жидких или гелеобразных образцов берут аналогичную навеску. Навеску помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 10 мл воды очищенной и 10 мл хлористоводородной кислоты 2 %, встряхивая в течение 10 мин. Объем полученного раствора доводят водой до метки, перемешивают и фильтруют; первые 10 мл фильтрата отбрасывают. 10,0 мл полученного раствора помещают в коническую колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 1 мл хлористоводородной кислоты 2 %, 0,5 мл калия йодида раствора 1 %, 2 мл крахмала раствора 0,5 %, воду до общего объема 20 мл и титруют раствором калия йодата 0,00167 М до появления стойкого светло-синего окрашивания.

Параллельно проводят контрольный опыт.

1 мл калия йодата раствора 0,00167 М соответствует 0,8824 мг $C_6H_8O_6$ (аскорбиновой кислоты).

Определение цинка в инсулине	**ОФС.1.2.3.0018.15** **Взамен ГФ X** **Взамен ст. ГФ XI, вып.2**

Требования данной статьи распространяются на лекарственные препараты инсулина, в состав которых входят соединения цинка. Определение цинка в препаратах инсулина проводят методом атомно-абсорбционной спектрометрии, измеряя поглощение излучения атомного пара цинка при длине волны его абсорбции.

Приготовление испытуемого раствора

1. ***Для раствора или суспензии препарата****.* В случае если испытуемый препарат представляет собой суспензию, во флакон или картридж добавляют хлористоводородной кислоты раствор 6 М в количестве 2 мкл (при активности инсулина 40 МЕ/мл) или 4 мкл (при активности 100 МЕ/мл) на 1 мл препарата, тщательно перемешивают.

Объединяют содержимое флаконов или не менее трех картриджей, перемешивают и проводят разведение в соответствии с таблицей.

Таблица – Разведения препарата в зависимости от его активности

Количество компонентов, взятых для разведения, мл	**Активность**	
	40 МЕ/мл	**100 МЕ/мл**
Препарат	2,5	1
0,01 М раствор HCl	до 25	до 25
Конечное разведение (Р)	10	25

При необходимости выполняют следующее разведение до конечной концентрации цинка в пределах 0,4 – 1,6 мкг/мл или указанной в фармакопейной статье.

2. ***Для надосадочной жидкости****.* Тщательно перемешивают содержимое каждого флакона или картриджа до гомогенного состояния, объединяют содержимое 3 флаконов или не менее 3 картриджей, отбирают 5 – 10 мл гомогенной суспензии, переносят в центрифужную пробирку и центрифугируют в течение 10 мин при 4000 – 6000 об/мин. Необходимое количество надосадочной жидкости для получения раствора с концентрацией цинка в пределах 0,2 – 1,6 мкг/мл помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора 0,01 М раствором хлористоводородной кислоты до метки и перемешивают.

3. ***Для субстанции****.* Точную навеску субстанции от 0,025 до 0,050 г помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, избегая пенообразования, растворяют в хлористоводородной кислоты растворе 0,01 М, доводят объем раствора той же кислотой до метки и перемешивают. Полученный раствор разводят хлористоводородной кислоты раствором 0,01 М до концентрации цинка в пределах 0,4 – 1,6 мкг/мл и перемешивают.

Методика

Определение атомного поглощения проводят на атомно-абсорбционном спектрофотометре в соответствии с инструкцией изготовителя к прибору при длине волны 213,9 нм с использованием цинковой лампы с полым катодом и воздушно-ацетиленового пламени. Кроме ламп с полым катодом можно использовать дуговые ксеноновые лампы в качестве источника сплошного спектра в сочетании с монохроматорами высокого разрешения.

В пламенный атомизатор атомно-абсорбционного спектрофотометра вводят свежеприготовленный испытуемый раствор и регистрируют атомное поглощение. В качестве раствора сравнения используют хлористоводородной кислоты раствор 0,01 М.

Концентрацию цинка (C, мкг/мл) в испытуемом растворе определяют по калибровочному графику.

Содержание цинка в препарате в мкг/мл (X_1) вычисляют по формуле:

$$X_1 = C \cdot N, \quad (1)$$

где C – концентрация цинка в испытуемом растворе, определенная по калибровочному графику, мкг/мл;

N – разведение препарата.

Содержание цинка в субстанции в пересчете на сухое вещество в процентах (X_2) вычисляют по формуле:

$$X_2 = \frac{C \cdot N \cdot 100 \cdot 100}{a \cdot 10^6 \cdot (100 - W)}, \quad (2)$$

где C – концентрация цинка в испытуемом растворе, определенная по калибровочному графику, мкг/мл;

N – разведение субстанции;

W – потеря в массе при высушивании, %;

a – навеска субстанции, г.

Построение калибровочного графика. В мерные колбы вместимостью 100 мл помещают разбавленный эталонный раствор цинк-иона (10 мкг/мл) в количествах: 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10,0; 12,0 и 16,0 мл, доводят объемы растворов до метки хлористоводородной кислоты раствором 0,01 М и перемешивают (получают растворы с содержанием цинка, соответственно, 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2 и 1,6 мкг/мл). Выбор пределов концентраций цинка зависит от содержания цинка в препарате и чувствительности атомно-абсорбционного спектрофотометра. Калибровка должна проводиться не менее чем по трем растворам.

Измеряют величину атомного поглощения полученных растворов и строят график, откладывая на оси ординат значение атомного поглощения, а на оси абсцисс концентрацию цинка в мкг/мл. При построении калибровочного графика используется наиболее подходящая функциональная зависимость (линейная или квадратичная). Коэффициент корреляции калибровочного графика должен составлять не менее 0,99.

Перед каждым анализом проводят калибровку прибора. Прибор считается пригодным к работе, если относительное стандартное отклонение,

рассчитанное для 6 последовательных измерений калибровочного раствора с концентрацией 0,8 мкг/мл, составляет не более 1,4 %.

Приготовление эталонного раствора цинк-иона (1 мг/мл). Эталонный раствор цинка готовят из цинка гранулированного (раствор А), цинка оксида (раствор Б) или используют готовый стандартный раствор для атомно-абсорбционной спектрометрии.

Хранят в течение срока годности в условиях, указанных на этикетке, или не более 2 мес.

Раствор А. Около 0,50 г (точная навеска) цинка гранулированного помещают в мерную колбу вместимостью 500 мл и растворяют в 5 мл хлористоводородной кислоты раствора 4 М, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Раствор Б. Около 0,6224 г (точная навеска) цинка оксида (х.ч.), предварительно прокаленного до постоянной массы при 500 °С, помещают в мерную колбу вместимостью 500 мл и растворяют в 5 мл хлористоводородной кислоты раствора 4 М, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Примечание. Приготовление хлористоводородной кислоты раствора 4 М. Разводят хлористоводородной кислоты раствор 6 М водой в 1,5 раза: к 50 мл кислоты прибавляют 25 мл воды и перемешивают или в мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 16 мл хлористоводородной кислоты концентрированной (плотность 1,19) или 17 мл (плотность 1,18), доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Хранят при температуре не выше 30 °С.

При приготовлении растворов А и Б допускается использование хлористоводородной кислоты раствора 5 М вместо раствора 4 М.

Приготовление разбавленного эталонного раствора цинк-иона (10 мкг/мл). 1,0 мл эталонного раствора цинк-иона (1 мг/мл) переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Раствор должен быть свежеприготовленным.

Определение сахаров спектрофотометрическим методом	**ОФС.1.2.3.0019.15 Вводится впервые**

Для определения сахаров используют спектрофотометрический метод. Его проводят, осуществляя измерение оптической плотности окрашенных растворов, образуемых при взаимодействии сахаров с антроновым или орциновым реактивами и пикриновой кислотой.

Метод определения с антроновым реактивом

Метод основан на расщеплении сложных углеводов до моносахаров в сильнокислой среде с последующей их дегидратацией и образованием гидроксиметилфурфурола, образующего при реакции с антроном комплексное соединение синевато-зеленого цвета. Интенсивность образовавшейся окраски прямо пропорциональна содержанию сахаров в реакционной среде.

Пропорциональная зависимость интенсивности окраски от содержания сахаров в испытуемом растворе соблюдается в области концентраций моносахаров 0,02 – 0,10 мг/мл.

Методика. В пробирку помещают 3,0 мл раствора испытуемого препарата (пробоподготовка и, если необходимо, методика гидролиза полисахаров до моносахаров должны быть описаны в фармакопейной статье), охлаждают в бане со льдом до 0 °С, осторожно при охлаждении приливают 6,0 мл 0,2 % антронового реактива, перемешивают и немедленно нагревают на кипящей водяной бане в течение 5 – 15 мин (точное время

должно быть указано в фармакопейной статье), охлаждают и измеряют оптические плотности испытуемого и стандартного растворов на спектрофотометре в максимуме поглощения при длине волны 625 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм относительно раствора сравнения.

Приготовление раствора сравнения. В охлажденную на бане со льдом пробирку с 3,0 мл воды приливают 6,0 мл 0,2 % антронового реактива. Далее проводят анализ аналогично раствору испытуемого препарата.

Приготовление стандартного раствора. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 0,10 г стандартного образца глюкозы, растворяют в воде или насыщенном растворе бензойной кислоты в воде, доводят этим же раствором до метки и перемешивают. Отбирают 2,0 мл полученного раствора в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят водой до метки и перемешивают. Полученный раствор содержит 0,02 мг/мл глюкозы. Далее проводят анализ аналогично раствору испытуемого препарата.

Вместо использования одного стандартного раствора, если указано в фармакопейной статье, строят калибровочный график, используя разведенные растворы стандартного образца глюкозы с концентрацией от 0,01 до 0,05 мг/мл.

Калибровочный график строят при каждом анализе.

Содержание сахаров в 1 мл раствора испытуемого препарата находят по калибровочной кривой зависимости оптической плотности калибровочных растворов от содержания стандартного образца глюкозы в 1 мл растворителя.

При анализе декстранов учитывают, что 1 г глюкозы соответствует 0,94 г декстранов.

Примечание. Приготовление 0,2 % антронового реактива. 0,20 г антрона помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют серную кислоту, свободную от азота, или смесь серная кислота, свободная от азота, – вода (19:1), тщательно перемешивают и помещают в темное место до полного растворения. До использования раствор выдерживают после приготовления не менее 4 ч.

Срок годности при хранении в темном месте при температуре 6 – 8 °С не более 7 сут.

При использовании антронового реактива для анализа глюкозы или декстранов проводят определение чувствительности реактива к глюкозе.

Осторожно прибавляют 6 мл антронового реактива (в смеси серная кислота, свободная от азота, – вода, 19:1) к 3 мл раствора *D*-глюкозы (5 мкг/мл), нагревают на водяной бане в течение 5 мин. Раствор, содержащий глюкозу, должен быть темнее раствора сравнения без глюкозы. Раствор сравнения темно-зеленого цвета.

Метод определения с пикриновой кислотой

Метод основан на цветной реакции моносахаров с пикриновой кислотой, протекающей с образованием пикраминовой кислоты в результате восстановления сахаром группы NO_2 до NH_2. Интенсивность образовавшейся окраски пропорциональна количеству определяемого сахара (0,1 – 0,8 мг/мл) в испытуемом растворе препарата. Пробоподготовка должна быть описана в фармакопейной статье.

В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 1,0 мл пикриновой кислоты раствора 1 %, 3,0 мл натрия карбоната раствора 20 % и 1 – 5 мл раствора испытуемого образца (точное количество должно быть указано в фармакопейной статье). Колбу погружают на 10 мин на кипящую водяную баню, охлаждают до комнатной температуры и доводят объем раствора водой до метки. Измеряют оптическую плотность испытуемого раствора и раствора стандартного образца глюкозы на спектрофотометре в максимуме поглощения при длине волны, указанной в фармакопейной статье (в области от 440 до 460 нм), в кювете с толщиной слоя 10 мм относительно раствора сравнения.

Приготовление раствора сравнения. Вместо раствора испытуемого образца используют воду, добавляя те же реактивы и проводя те же операции, что и с раствором испытуемого образца препарата.

Примечания.

1. Приготовление раствора стандартного образца глюкозы. Около 0,05 г (точная навеска) глюкозы, предварительно высушенной при температуре 100 – 105 °С до постоянной массы, помещают в мерную колбу вместимостью

250 мл, растворяют в воде, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

1 мл раствора стандартного образца содержит около 0,2 мг глюкозы.

Раствор должен быть свежеприготовленным.

2. Приготовление пикриновой кислоты раствора 1 %. 1 г кислоты пикриновой помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 90 мл воды на кипящей водяной бане, охлаждают до комнатной температуры, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Срок годности раствора при хранении в склянках с притертой пробкой в защищенном от света месте 1 мес.

Метод определения с орциновым реактивом

При нагревании пентоз (или их фосфорных производных) в присутствии кислот от них отщепляется вода и образуется фурфурол; в присутствии орцина и железа(III) хлорида при этом развивается зеленое окрашивание.

Чувствительность метода определения значительно выше с рибозой, чем с дезоксирибозой и гексозами.

В пробирку помещают 2,0 мл разведенного в воде препарата с содержанием рибозы около 2,5 – 25,0 мкг/мл, прибавляют 2,0 мл железа(III) хлорида раствора 0,05 % в хлористоводородной кислоте концентрированной, смесь встряхивают, прибавляют 0,2 мл орцина раствора 10 % в этаноле. Пробирку со смесью помещают в кипящую водяную баню на 20 мин, затем охлаждают в ледяной воде. По достижении комнатной температуры измеряют оптическую плотность раствора испытуемого образца препарата на спектрофотометре в максимуме поглощения при длине волны 670 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм относительно раствора сравнения.

Приготовление раствора сравнения. Вместо раствора испытуемого образца используют воду, добавляя те же реактивы и проводя те же операции, что и с раствором испытуемого образца препарата.

Содержание сахаров (пентоз) в 1 мл испытуемого раствора препарата находят по калибровочной кривой зависимости оптической плотности калибровочных растворов от содержания рибозы в мкг/мл воды.

Построение калибровочного графика. Перед определением разводят стандартный раствор рибозы в 10 раз водой (рабочий раствор). В 6 пробирок вносят 0,10, 0,20, 0,40, 0,60, 0,80 и 1,0 мл рабочего раствора, в каждую пробирку прибавляют воду до 2,0 мл и далее проводят те же операции, что и с испытуемым раствором.

Примечания.

1. Приготовление раствора стандартного образца рибозы. 25,0 мг стандартного образца рибозы (с содержанием не менее 99,0 %) помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в воде, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Раствор используют свежеприготовленным.

2. Приготовление железа(III) хлорида раствора 0,05 %. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 0,050 г $FeCl_3 \cdot 6 H_2O$, растворяют в хлористоводородной кислоте концентрированной, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Срок годности раствора 1 мес.

3. Приготовление орцина раствора 10 % в этаноле. 10,0 г орцина помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в этаноле, доводят объем раствора до метки этим же растворителем и перемешивают.

Раствор используют свежеприготовленным и защищают от света.

Спектрофотометрическое определение фосфора	**ОФС.1.2.3.0020.15** **Вводится впервые**

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на метод спектрофотометрического определения фосфора после окислительного разложения, в результате которого фосфор переводится в фосфат-ионы, образующие с молибденовой кислотой окрашенные соединения.

Выбор метода спектрофотометрического определения фосфора и способа минерализации связан с составом, свойствами лекарственного средства и количеством содержащегося в нем фосфора.

Минерализацию осуществляют методами:

1) сжигания в атмосфере кислорода;

2) сжигания с окислительными смесями концентрированных кислот;

3) сухой минерализацией – сплавлением с твердыми окислителями.

В ряде случаев (при определении фосфора фосфолипидов, нуклеиновых кислот и других соединений) до минерализации проводят выделение испытуемого вещества.

Определение фосфора нуклеиновых кислот по Спирину проводят спектрофотометрическим методом с определением оптической плотности при двух значениях длин волн 270 и 290 нм в ультрафиолетовой области спектра.

Способы минерализации

Метод 1. Сжигание в колбе с кислородом

Испытание проводят в соответствии с ОФС «Метод сжигания в колбе с кислородом».

Метод 2. Сжигание с окислительными смесями концентрированных кислот

Методика 1 (для препаратов из животного и растительного сырья). Точную навеску (или точный объем) препарата, указанную в фармакопейной статье, содержащую 0,2 – 0,3 мг фосфора, помещают в колбу Къельдаля; прибавляют 3 мл серной кислоты концентрированной и 3 мл азотной кислоты концентрированной (или 3 мл хлорной кислоты), перемешивают. Колбу закрывают стеклянной воронкой и осторожно нагревают при 50 °С, постепенно усиливая нагрев до температуры 200 – 300 °С. Через 10 мин после начала нагревания прибавляют по каплям 1 мл азотной кислоты концентрированной; добавление кислоты по 1 мл повторяют каждые 5 мин до получения раствора слабо-желтого цвета. К охлажденному раствору осторожно небольшими порциями прибавляют 20 мл воды и кипятят еще 30 мин.

Одновременно в аналогичных условиях минерализуют контрольную пробу.

Методика 2 (преимущественно для витаминных препаратов с минералами). Точную навеску препарата, эквивалентную содержанию фосфора

100 мг или указанному в фармакопейной статье, помещают в колбу Къельдаля или высокую термостойкую пробирку, прибавляют 25 мл азотной кислоты концентрированной, осторожно нагревают в течение 30 мин на газовой горелке, электрическом колбонагревателе или плитке, прибавляют 15 мл хлористоводородной кислоты концентрированной и продолжают нагревание до исчезновения бурых паров.

Метод 3. Сухая минерализация

Методика 3 (для витаминных препаратов с минералами). Точную навеску предварительно подготовленного как описано в фармакопейной

статье препарата помещают в платиновый или кварцевый тигель (при необходимости в препаратах с маслом тигель переносят в сушильный шкаф при 110 °С на 10 мин или более для полной абсорбции масла магния оксидом), затем осторожно сжигают на открытом пламени газовой горелки или электроплитке в присутствии магния оксида (от 3,0 мг до 2,5 г; количество магния оксида должно быть указано в фармакопейной статье) до обугливания, затем продолжают сжигание в муфельной печи при температуре 800 – 1000 °С до тех пор, пока весь остаток не станет белого цвета (около 1 – 5 ч).

Спектрофотометрические методики определения фосфора

Образующиеся после минерализации фосфат-ионы взаимодействуют с молибденовой кислотой с образованием желтых гетерополикомплексов – фосфорномолибденовых кислот, переходящих под действием восстановителей (аскорбиновой кислоты, гидразина сульфата, эйконогена, метола или других) в фосфорномолибденовую синь, интенсивность окраски которой пропорциональна содержанию фосфора. Состав фосфорномолибденовой сини зависит от природы восстановителя, кислотности раствора, температуры и других условий. От природы восстановителя зависят скорость реакции, чувствительность метода, положение максимума поглощения.

Определяют положение максимума в спектре поглощения фосфорномолибденовой сини для испытуемого препарата. При необходимости перед проведением цветной реакции испытуемый раствор нейтрализуют натрия гидроксида раствором 5 М (или другой концентрации, указанной в фармакопейной статье) в присутствии 1 – 2 капель фенолфталеина раствора 1 %, избыток щелочи нейтрализуют серной кислоты раствором 0,05 М (или другой концентрации, указанной в фармакопейной статье).

Методика А (преимущественно для витаминных препаратов с минералами, с аскорбиновой кислотой). Метод минерализации и

приготовление раствора должны быть указаны в фармакопейной статье. В три мерные колбы вместимостью 25 мл отдельно помещают 2,0 мл раствора, приготовленного после минерализации, 2,0 мл стандартного раствора калия фосфата однозамещенного с концентрацией фосфора 20 мкг/мл (примечание 1) и 2,0 мл воды (контрольный раствор). В каждую из трех колб прибавляют по 10 мл ацетатного буферного раствора, pH 3,9 – 4,1 (примечание 14), 2,5 мл аммония молибдата раствора 1 % в растворе серной кислоты (примечание 15) и 2,5 мл свежеприготовленного аскорбиновой кислоты раствора 1 % (примечание 3), доводят объемы растворов ацетатным буферным раствором, pH 3,9 – 4,1, до метки и перемешивают. Точно через 10 мин после добавления аскорбиновой кислоты раствора 1 % измеряют оптическую плотность испытуемого и стандартного растворов относительно контрольного раствора на спектрофотометре в максимуме поглощения при длине волны 740 нм в кювете с толщиной слоя 1 см.

Содержание фосфора в препарате в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot V \cdot C \cdot 100}{A_0 \cdot a \cdot 10^6},$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора;

A_0 – оптическая плотность стандартного раствора;

C – концентрация фосфора в стандартном растворе калия фосфата однозамещенного, мкг/мл (20 мкг/мл);

a – навеска препарата, г;

V – объем воды, используемый для приготовления раствора после минерализации, мл.

Методика Б (преимущественно для препаратов из животного и растительного сырья). Проводят минерализацию, как указано в методике 1 метода 2. Содержимое колбы количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой до метки, перемешивают и фильтруют через сухой бумажный фильтр (обеззоленный «синяя лента»), отбрасывая первые 15 мл фильтрата. 15,0 мл фильтрата

помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 35 мл воды, 5,0 мл восстанавливающего раствора (примечание 4), 10 мл раствора аммония молибдата (примечание 6) и оставляют на 10 мин при комнатной температуре, периодически перемешивая. Соотношение фильтрата и воды (общий объем 50 мл) может быть изменено в зависимости от содержания фосфора в фильтрате.

Параллельно в аналогичных условиях готовят стандартный и контрольный растворы, помещая в мерную колбу вместимостью 100 мл 20,0 мл стандартного раствора калия фосфата однозамещенного с содержанием фосфора 20 мкг/мл (примечание 1), 30 мл воды (стандартный раствор) или 50 мл воды (контрольный раствор) и те же количества реактивов, как для испытуемого раствора.

Точно через 10 мин в колбы с испытуемым, стандартным и контрольным растворами прибавляют по 20 мл насыщенного раствора натрия ацетата (см. примечание 5), доводят объем раствора в каждой колбе водой до метки (100 мл), тщательно перемешивают и через 20 – 25 мин измеряют оптическую плотность испытуемого и стандартного растворов на спектрофотометре в максимуме поглощения при длине волны 725 нм в кювете с толщиной слоя 1 см относительно контрольного раствора.

Содержание фосфора в препарате в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot C \cdot 20 \cdot 100 \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot a \cdot 100 \cdot V \cdot 10^6} = \frac{A \cdot C \cdot 20 \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot a \cdot V \cdot 10^6},$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора;

A_0 – оптическая плотность стандартного раствора;

C – концентрация фосфора в стандартном растворе калия фосфата однозамещенного, мкг/мл (20 мкг/мл);

a – навеска препарата, г;

V – объем фильтрата, взятый для реакции, мл;

20, 100, 100, 100 – объемы аликвотных частей растворов и вместимости мерных колб, мл.

Методика В (преимущественно для витаминных препаратов с минералами, с гидрохиноном). Способ минерализации, навеска препарата или содержание фосфора в пробе должны быть указаны в фармакопейной статье. Полученный остаток после минерализации с помощью воды количественно переносят в мерную колбу вместимостью 500 мл, растворяют в воде и доводят объем раствора водой до метки. Отбирают 10,0 мл полученного раствора и переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Затем в три отдельные мерные колбы вместимостью 25 мл помещают по 5,0 мл испытуемого раствора, стандартного раствора калия фосфата однозамещенного с содержанием фосфора 20 мкг/мл (примечание 1) и воды (контрольный раствор), в каждую из трех колб прибавляют по 1 мл раствора аммония молибдата (примечание 9), 1 мл раствора гидрохинона (примечание 10) и 1 мл раствора натрия гидросульфита (примечание 11), перемешивают. Доводят объемы растворов в каждой колбе водой до метки, перемешивают и оставляют на 30 мин, затем измеряют оптическую плотность испытуемого и стандартного растворов относительно контрольного раствора на спектрофотометре в максимуме поглощения при длине волны 650 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Содержание фосфора в препарате в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 25 \cdot C \cdot 500 \cdot 100 \cdot 100 \cdot 5}{A_0 \cdot a \cdot 5 \cdot 10 \cdot 10^6 \cdot 25} = \frac{A \cdot C \cdot 500 \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot a \cdot 10 \cdot 10^6},$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора;

A_0 – оптическая плотность стандартного раствора;

C – концентрация фосфора в стандартном растворе калия фосфата однозамещенного, мкг/мл (20 мкг/мл);

a – навеска препарата, г;

5,10, 25, 100, 500 – объемы аликвотных частей растворов и мерных колб, мл.

Методика Г (для определения примесей или количественного определения фосфора, с эйконогеном). Полученный остаток после минерализации (методику выбирают в зависимости от природы вещества) растворяют в 10 мл воды и количественно переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл, перемешивают, туда же прибавляют 0,75 мл раствора аммония молибдата (примечание 12), 1 мл раствора эйконогена (примечание 13), доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Готовят стандартный раствор, помещая 1 – 3 мл стандартного раствора калия фосфата однозамещенного с содержанием фосфора 5 мкг/мл (примечание 1) в мерную колбу вместимостью 25 мл, добавляя те же реактивы, что и в испытуемый раствор.

Измеряют оптическую плотность испытуемого и стандартного растворов относительно контрольного раствора на спектрофотометре в максимуме поглощения при длине волны 620 нм в кювете с толщиной слоя 1 см относительно контрольного раствора.

Содержание фосфора в препарате в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot C \cdot 25 \cdot V_0 \cdot 100}{A_0 \cdot a \cdot 25 \cdot 10^6} = \frac{A \cdot C \cdot V_0 \cdot 100}{A_0 \cdot a \cdot 10^6},$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора;

A_0 – оптическая плотность стандартного раствора;

C – концентрация фосфора в стандартном растворе калия фосфата однозамещенного, мкг/мл (5 мкг/мл);

a – навеска препарата, г;

V_0 – объем стандартного раствора калия фосфата однозамещенного, мл;

25 – объем мерной колбы, мл.

Для нормирования предельного содержания примесей возможно сравнение оптических плотностей испытуемого и стандартного растворов. Оптическая плотность испытуемого раствора не должна превышать оптическую плотность стандартного раствора.

Методика Д (преимущественно для витаминных препаратов с минералами, с гидразина сульфатом). Остаток после минерализации (способ минерализации указывают в фармакопейной статье), содержащий от 0,25 до 1,50 мг фосфора, переносят в мерную колбу вместимостью 500 мл с помощью 40 – 50 мл воды, прибавляют 20 мл серной кислоты раствора 1 М и перемешивают. Если остаток не растворился, прибавляют еще небольшое количество серной кислоты раствора1 М, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

5,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 20 мл молибденового реагента (примечание 8), 50 мл воды и нагревают на кипящей водяной бане в течение 30 мин. Охлаждают до комнатной температуры, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Измеряют оптическую плотность полученного раствора относительно контрольного раствора на спектрофотометре в максимуме поглощения при длине волны 830 нм в кювете с толщиной слоя 1 см и определяют концентрацию фосфора в испытуемом растворе по калибровочному графику.

Построение калибровочного графика. В мерные колбы вместимостью 100 мл помещают 2,0; 5,0; 7,5; 10,0 и 15,0 мл стандартного раствора калия фосфата однозамещенного с содержанием фосфора 10 мкг/мл (примечание 1), прибавляют по 20 мл молибденового реагента и далее поступают, как указано выше для испытуемого раствора.

Строят калибровочный график, откладывая по оси ординат оптическую плотность, а по оси абсцисс – концентрацию фосфора в мкг/мл.

Содержание фосфора в препарате в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{C \cdot 500 \cdot 100 \cdot 100}{a \cdot 5 \cdot 10^6},$$

где C – концентрация фосфора, определенная по калибровочному графику, мкг/мл;

a – навеска препарата, г;

5, 100, 500 – объемы аликвотных частей растворов и мерных колб, мл.

Примечания.

Приготовление реактивов для спектрофотометрического определения фосфора. Вода и все используемые реактивы не должны содержать примесей фосфора, мешающих определению.

1. Приготовление стандартного раствора калия фосфата однозамещенного.

1.1. Основной стандартный раствор калия фосфата однозамещенного. 0,4395 г калия фосфата однозамещенного, высушенного до постоянной массы при температуре 105 °С, помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, прибавляют 700 – 800 мл воды, 20 мл 0,05 М раствора серной кислоты, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают (раствор содержит 100 мкг/мл фосфора).

Срок годности полученного раствора 1 мес.

1.2. Из основного стандартного раствора готовят стандартные растворы калия фосфата однозамещенного для каждого метода в соответствии с приведенной ниже таблицей.

Методика	Содержание фосфора в стандартном растворе, мкг/мл	Количество основного стандартного раствора (с содержанием фосфора 100 мкг/мл), мл	Количество воды в мерной колбе, мл
А, Б, В	20	20,0	до 100
Г	5	5,0	до 100
Д	10	10,0	до 100

2. Приготовление 3 М раствора серной кислоты. В мерную колбу вместимостью 1000 мл приливают 700 мл воды, осторожно по каплям при перемешивании и охлаждении (в сосуде с холодной водой) прибавляют 168 мл серной кислоты концентрированной; после охлаждения раствора до комнатной температуры доводят объем раствора водой до метки.

3. Приготовление аскорбиновой кислоты раствора 1 % (для методики А). Помещают 1,0 г аскорбиновой кислоты в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в воде, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Полученный раствор используют в течение 1 дня.

4. Приготовление восстанавливающего раствора для методики Б. 4,0 г метола и 10,0 г натрия сульфита растворяют в 150 мл воды в мерной колбе вместимостью 1000 мл, прибавляют 196 г натрия метабисульфита, растворенного в 600 мл воды, доводят объем раствора водой до метки, перемешивают и фильтруют через фильтр «Синяя лента».

Срок годности раствора 30 сут.

5. Приготовление насыщенного раствора натрия ацетата. 420 г натрия ацетата помещают в колбу вместимостью 1000 мл, прибавляют 500 мл воды,

перемешивают и оставляют на 1 сут. Раствор над осадком фильтруют через фильтр «Синяя лента».

Срок годности раствора 30 сут.

6. Приготовление раствора аммония молибдата для методики Б. 50,0 г аммония молибдата растворяют в 500 мл воды в мерной колбе вместимостью 1000 мл, доводят объем раствора 3 М раствором серной кислоты до метки, перемешивают и фильтруют.

Срок годности раствора 30 сут.

7. Проба на содержание фосфора в реактивах 4, 5 и 6. При смешивании 5 мл восстанавливающего раствора, 10 мл раствора аммония молибдата и 20 мл насыщенного раствора натрия ацетата не должно появляться синего окрашивания.

8. Приготовление молибденового реагента для методики Д. Около 6,860 г (точная навеска) натрия молибдата растворяют в 200 мл воды (раствор А); 0,40 г гидразина сульфата растворяют в 100 мл воды (раствор Б). В мерную колбу вместимостью 1000 мл с 500 мл воды осторожно прибавляют при охлаждении и перемешивании 100 мл серной кислоты концентрированной, туда же полностью переносят растворы А и Б, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Реагент используют свежеприготовленным.

9. Приготовление раствора аммония молибдата для методики В. 12,50 г аммония молибдата растворяют в 150 мл воды, прибавляют 100 мл раствора серной кислоты (37,5 мл серной кислоты концентрированной и 100 мл воды).

Срок годности раствора 14 сут.

10. Приготовление раствора гидрохинона. 0,50 г гидрохинона помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в воде, прибавляют 1 каплю серной кислоты концентрированной, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Раствор используют свежеприготовленным.

11. Приготовление раствора натрия гидросульфита. 20,0 г натрия гидросульфита помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Срок годности при хранении в темном месте 7 сут.

12. Приготовление раствора аммония молибдата для методики Г. 8,30 г аммония молибдата помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 40 мл воды, прибавляют 33 мл серной кислоты разведенной (2 мл серной кислоты концентрированной в 7 мл воды), доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Срок годности раствора 14 сут.

13. Приготовление раствора эйконогена. Готовят одним из двух способов.

А) 0,750 г натрия сульфита, 14,150 г натрия гидросульфита и 0,1050 г эйконогена помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в воде, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Полученный раствор используют свежеприготовленным.

Б) Готовят сухую смесь из 5,0 г натрия сульфита, 94,3 г натрия гидросульфита и 0,70 г эйконогена при тщательном перемешивании. В день определения 1,5 г сухой смеси помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, растворяют в воде, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

14. Приготовление ацетатного буферного раствора pH 3,9 – 4,1. В мерную колбу вместимостью 200 мл помещают 10 мл уксусной кислоты раствора 1 М, 25 мл натрия ацетата раствора 0,1 М, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают; pH полученного раствора 3,9 – 4,1 (потенциометрически).

Срок годности полученного раствора 3 мес.

15. Приготовление аммония молибдата раствора 1 % в растворе серной кислоты для методики А. 1 г аммония молибдата растворяют в 50 мл воды в мерной колбе вместимостью 100 мл, прибавляют калиброванной пипеткой 0,11 мл серной кислоты разведенной (1 часть серной кислоты концентрированной и 5 частей воды) и доводят объем раствора водой до метки.

Срок годности полученного раствора 1 мес.

16. Приготовление 0,05 М раствора серной кислоты. В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 50 мл серной кислоты раствора 1 М, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Определение фосфора нуклеиновых кислот по Спирину

Метод основан на измерении разности поглощений в ультрафиолетовой области при двух значениях длин волн после обработки испытуемого препарата раствором хлорной кислоты при нагревании. В фармакопейных статьях в зависимости от соотношения содержания нуклеиновых кислот (дезоксирибонуклеиновой и рибонуклеиновой, а также их фрагментов) допускаются модификации методик гидролиза.

Методика. К 1 мл раствора препарата, содержащего 15 – 35 мкг нуклеиновых кислот, помещенного в термостойкую центрифужную пробирку (или колбу), прибавляют 5 мл хлорной кислоты раствора 0,5 М (другие условия указывают в фармакопейной статье) и закрывают стеклянным колпачком или присоединяют воздушный холодильник. Смесь

нагревают на кипящей водяной бане в течение 20 мин. После охлаждения пробы при необходимости (при наличии осадка) центрифугируют при 2000 об/мин в течение 20 мин. Измеряют оптическую плотность гидролизованного прозрачного раствора или надосадочной жидкости при длинах волн 270 и 290 нм в кювете с толщиной слоя 1 см; при высоких значениях оптической плотности растворы разводят хлорной кислоты раствором 0,5 М (разведение должно быть указано в фармакопейной статье). В качестве контрольного раствора используют хлорной кислоты раствор 0,5 М.

Метод применим при выполнении условия: A_{270} и A_{290} не должны отличаться более чем на 15 %.

Содержание фосфора в препарате в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(A_{270} - A_{290}) \cdot N \cdot 100}{\Delta A_{1\text{см}} \cdot b \cdot a \cdot 10^6},$$

где A_{270} – оптическая плотность испытуемого раствора при 270 нм;

A_{290} – оптическая плотность испытуемого раствора при 290 нм;

N – разведение препарата (в данном описании равно 6);

$\Delta A_{1\text{см}} = 0{,}19$ – разность удельных показателей поглощения нуклеиновых кислот при длинах волн 270 и 290 нм при содержании фосфора 1 мкг/мл;

b – толщина поглощающего слоя, см;

a – навеска препарата, г.

Определение адсорбционной активности энтеросорбентов	**ОФС.1.2.3.0021.15** **Вводится впервые**

Энтеросорбенты – лекарственные средства, способные адсорбировать в пищеварительном тракте различные химические вещества и биологические объекты эндо- и экзогенного происхождения, не вступая с ними в химическую реакцию.

Энтеросорбенты имеют пористую структуру, которая представляет собой полостные образования в веществе сорбента в виде каналов – пор. При этом различают макропоры – полостные образования радиусом свыше 200 нм, мезопоры – размером от 100 до 1,6 нм и микропоры – образования менее 1,6 нм. Микропоры хорошо адсорбируют молекулы небольшого размера, а мезопоры и макропоры – более крупные органические молекулы.

За счет разветвленности поверхностной структуры пор формируется большая площадь поверхности на единицу массы сорбента. Кроме того, площадь активной поверхности обратно пропорциональна размеру частиц сорбента, т.е. чем меньше частицы, на которые он распадается в желудочно-кишечном тракте, тем выше площадь их суммарной поверхности.

Результатом взаимодействия поверхностных сил сорбента с поликомпонентными средами являются накопление и фиксация в порах сорбента сорбируемых веществ, растворенных в жидкостях, что ведет к снижению их концентрации в окружающей среде. Связывание адсорбата на сорбенте является динамически равновесным процессом и лимитировано адсорбционной активностью используемого сорбента.

Адсорбционная активность (адсорбционная способность, сорбционная емкость, емкость адсорбции, сорбционный объем пор)* является специфическим показателем качества для лекарственных средств группы энтеросорбентов и используется для характеристики поглощающей способности сорбента, определяющей количество адсорбата (реактива), которое может поглотить сорбент на единицу своей массы.

По химической структуре различают следующие энтеросорбенты.

1. Углеродные энтеросорбенты – энтеросорбенты на основе углерода, которые подразделяются на сорбенты из древесного угля (активированный уголь на основе березовой древесины), косточковые активированные угли на основе костей животных и косточек фруктов, скорлупы орехов, сферические гранулированные синтетические сорбенты. В активированных углях существуют все разновидности пор. Например, большая доля макропор характерна для активированных углей на основе древесины, большая доля микропор характерна для активированных углей на основе скорлупы кокоса.
2. Кремнийсодержащие энтеросорбенты:

- на основе кремния диоксида коллоидного, состоящего из непористых, почти сферических частиц, которые со временем за счет физико-химического взаимодействия объединяются в агрегаты размером от 100 до 200 нм;

- гидрогели и ксерогели метилкремниевой кислоты, имеющие структуру пространственно-сшитой глобулярной пористой матрицы, где размер глобул составляет от 7 до 15 нм. Глобулы соединяются между собой, формируя поры, радиус которых более 100 нм;

- смектит диоктаэдрический, частицы размером 1 – 2 мкм состоят из слоистых образований толщиной 1 – 2 нм.

- магния алюмосиликата гидрата коллоидного (аттапульгит). Частицы представляют собой агломераты с размером от 60 до 610 нм.

3. Природные органические энтеросорбенты – энтеросорбенты на основе пищевых волокон, гидролизного лигнина с размером частиц 0,01 – 0,25 мм.

4. Комбинированные энтеросорбенты, в состав которых могут входить два и более типов указанных энтеросорбентов.

В зависимости от лекарственной формы энтеросорбенты разделяют на таблетки, капсулы, гранулы, порошки, пасты, гели для приема внутрь, взвеси (суспензии), коллоидные растворы.

В зависимости от механизмов сорбции энтеросорбенты делят на адсорбенты, абсорбенты, ионообменные материалы, сорбенты с каталитическими свойствами, сорбенты с комплексным механизмом действия.

По селективности различают селективные (гидрогели метилкремниевой кислоты), моно-, би-, полифункциональные, неселективные (угли активированные, природные препараты – лигнин, хитин, целлюлоза) энтеросорбенты.

Выбор реактива (адсорбата) зависит от физико-химических свойств энтеросорбента. Если не указано иначе, в качестве реактивов используют красители (метиленовый синий, конго красный, метиловый оранжевый), желатин с биуретовым реактивом, бензол, феназон.

Для определения адсорбционной активности энтеросорбентов используют следующие методы:

– спектрофотометрический метод, адсорбционную активность энтеросорбента определяют по разнице значений оптических плотностей раствора реактива после контакта и до контакта с энтеросорбентом в течение определенного времени;

– титриметрический метод, определение основано на титровании избытка реактива (неадсорбированное количество), оставшегося после контакта с препаратом, например, йодометрическое титрование (избыток метиленового синего), бромат-бромидное титрование (избыток феназона);

– гравиметрический метод, определение основано на поглощении лекарственным средством паров бензола в течение определенного времени. Расчет адсорбционной активности (сорбционный объем пор) проводится по

разности массы сорбента после и до взаимодействия с парами бензола с учетом плотности бензола.

В фармакопейной статье на лекарственное средство из группы энтеросорбентов для определения адсорбционной активности должны быть указаны:

- метод;
- нормативные пределы адсорбционной активности, которые в соответствии с анализируемой лекарственной формой могут быть выражены в: мг/табл, мг/капс, мг/г, мкг/мл, мкмоль/г, $см^3$/г;
- навеска лекарственного средства (мг);
- реактив;
- методика приготовления раствора реактива (с указанием используемого растворителя);
- методика проведения испытания (с указанием прибора для встряхивания, времени и числа колебаний в минуту, аналитической длины волны при спектрофотометрическом определении, условий центрифугирования с указанием числа оборотов в минуту и времени центрифугирования или фильтрование с указанием типа фильтра);
- условия определения при титриметрическом и гравиметрическом методах;
- расчетные формулы.

**Примечание.* В фармакопейных статьях и нормативной документации может быть указано различное название данного показателя.

Определение аминного азота методами формольного и йодометрического титрования	**ОФС.1.2.3.0022.15** **Вводится впервые**

Определение азота свободных аминногрупп в препаратах аминокислот, пептидов, белков и других с содержанием азота 1,5 – 5,0 мг в 1 мл испытуемого раствора проводят методом формольного титрования (метод Серенсена), основанном на защите формальдегидом свободных аминогрупп (образование оснований Шиффа) и алкалиметрическом титровании эквивалентного количества карбоксильных групп. Метод неприменим в присутствии ионов аммония, завышающих результаты определения.

Определение аминного азота в препаратах с более низким его содержанием (около 0,01 – 0,06 мг в 1 мл испытуемого раствора) проводят методом Попе-Стевенса. Метод основан на взаимодействии аминокислот в щелочном растворе с ионами двухвалентной меди и последующем йодометрическом титровании.

Метод формольного титрования (метод Серенсена)

К точной навеске или точному объему (указывают в фармакопейной статье) испытуемого образца прибавляют воду до объема 20 мл. При необходимости раствор нейтрализуют потенциометрически до pH 7,0, путем прибавления натрия гидроксида раствора 0,1 М или хлористоводородной кислоты раствора 0,1 М. По окончании нейтрализации прибавляют от 2 до 10 мл (указывают в фармакопейной статье) формальдегида раствора 35 %, нейтрализованного в день анализа натрия гидроксида раствором 10 % до pH

7,0, перемешивают и титруют натрия гидроксида раствором 0,1 М до значения pH 9,1, не изменяющегося при перемешивании в течение 2 мин, или до появления слабо-розового окрашивания (индикатор – фенолфталеина раствор 1 %).

Параллельно проводят контрольный опыт.

1 мл натрия гидроксида раствора 0,1 М соответствует 1,4 мг аминного азота.

Метод йодометрического титрования (метод Попе-Стевенса)

В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают точную навеску (указывают в фармакопейной статье) испытуемого образца, прибавляют 4 мл воды, 0,5 мл тимолфталеина раствора 0,1 %, перемешивают и по каплям прибавляют натрия гидроксида раствор 0,5 М до слабого голубого окрашивания. Прибавляют 20 мл суспензии меди фосфата, перемешивают. При исчезновении осадка прибавляют еще 5 мл суспензии меди фосфата, объем раствора в колбе доводят водой до метки, перемешивают и фильтруют через плотный бумажный фильтр (синяя лента). Фильтрат должен быть прозрачным. Отбирают 10 мл фильтрата в коническую колбу, прибавляют 0,4 мл уксусной кислоты ледяной, прибавляют 7,5 мл калия йодида раствора 10 % и выделившийся йод титруют натрия тиосульфата раствором 0,01 М. В конце титрования, когда раствор примет соломенно-желтую окраску, прибавляют 1,5 мл раствора крахмала и продолжают титрование до исчезновения появившейся синей окраски.

Параллельно проводят контрольный опыт.

1 мл натрия тиосульфата раствора 0,01 М соответствует 0,28 мг аминного азота.

Примечания.

1. Приготовление раствора меди(II) хлорида. В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 27,3 г меди(II) хлорида, растворяют в 500 мл воды, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

2. Приготовление раствора натрия фосфата.

А) 68,5 г натрия фосфата додекагидрата помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, растворяют в 500 мл воды, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают;

или

Б) 64,5 г динатрия гидрофосфата додекагидрата помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, растворяют в 500 мл воды, освобожденной от углерода диоксида кипячением, прибавляют 7,2 г натрия гидроксида, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

3. Приготовление боратного буферного раствора. В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 28,6 г натрия тетрабората, растворяют в 750 мл воды, прибавляют 50 мл хлористоводородной кислоты раствора 1 М, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают (pH 8,8).

4. Приготовление суспензии меди фосфата. Смешивают один объем раствора меди(II) хлорида с двумя объемами раствора натрия фосфата и двумя объемами боратного буферного раствора.

Раствор готовят перед использованием.

Определение свинца в глюкозе **ОФС.1.2.3.0023.18**

Вводится впервые

Требования настоящей общей фармакопейной статьи распространяются на методы количественного определения свинца в глюкозе.

Определение свинца в глюкозе проводят методом атомно-абсорбционной спектрометрии (ААС) в соответствии с ОФС «Атомно-адсорбционная спектрометрия» или методом атомно-эмиссионной спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой (АЭС ИСП) в соответствии с ОФС «Атомно-эмиссионная спектрометрия».

Субстанция должна содержать не более 0,00005 % (0,5 ppm) свинца.

Метод 1: определение свинца методом ААС.

Испытуемый раствор. 20,0 г субстанции растворяют в смеси равных объемов уксусной кислоты разведенной 12 % и воды, доводят объем раствора этой смесью растворителей до 100,0 мл и перемешивают. Прибавляют 2,0 мл насыщенного раствора (около 10 г/л) аммония пирролидиндитиокарбамата и 10 мл метилизобутилкетона, встряхивают в течение 30 сек в защищенном от света месте. Оставляют до расслоения. Для испытания отбирают слой метилизобутилкетона.

Растворы сравнения. Готовят три раствора сравнения аналогично испытуемому раствору, но с добавлением к 20,0 г испытуемой субстанции соответственно 0,5 мл, 1,0 мл и 1,5 мл эталонного раствора свинца (10 ppm Pb).

Примечание. Приготовление эталонного раствора свинца 10 ppm: 10,0 мл стандартного раствора 100 мкг/мл свинец-иона (ОФС «Тяжёлые металлы») доводят водой до 100,0 мл.

Устанавливают нулевую точку на приборе, используя метилизобутилкетон, обработанный аналогично испытуемому раствору, но без добавления испытуемого вещества. Измеряют поглощение испытуемого раствора и раствора сравнения, при длине волны 283,3 нм, используя в качестве источника излучения лампу с полым свинцовым катодом и воздушно-ацетиленовое пламя.

Метод 2:определения свинца в глюкозе методом АЭС-ИСП.

Испытуемый раствор. 5,0 г субстанции (глюкоза) растворяют в 10 мл 6% раствора азотной кислоты при нагревании 60^0C, при перемешивании в течение 20 мин. Затем переносят содержимое в колбу на 25 мл и доводят до метки 6% раствором азотной кислоты.

Приготовление 6% раствора азотной кислоты. 6 мл азотной кислоты концентрированной свободной от свинца помещают в колбу вместимостью 100 мл, доводят до метки деоинизованной водой и перемешивают.

Проведения измерений. Измерение проводят методом стандартных добавок. В четыре мерные колбы на 10 мл, кроме одной, прибавляют пропорционально увеличивающиеся объемы 0,5, 1,0, 1,5 мл стандартного раствора свинца с концентрацией 10 мг/л. Доводят содержимое каждой колбы испытуемым раствором до метки. Содержания свинца проводят путем сравнения эмиссии испытуемого раствора с эмиссией растворов с добавками растворов элемента известной концентрации на длинах волн свинца 220,353 нм и 283,306 нм. Измерения проводят для каждого раствора не менее трех раз. За результат измерений принимают среднее арифметическое по двум длинам волн.

Методом наименьших квадратов рассчитывают параметры линейного уравнения зависимости среднего значения результата измерения эмиссии от

концентрации раствора и вычисляют концентрацию определяемого элемента в испытуемом растворе. Для этого строят график зависимости среднего результата измерения эмиссии от добавленного количества определяемого элемента. Экстраполируют линию, соединяющую эти точки на графике, до пересечения с осью абсцисс. Расстояние от начала координат до полученной точки пересечения дает концентрацию определяемого элемента в испытуемом растворе.

Определение метанола и 2-пропанола	**ОФС 1.2.3.0024.18** **Вводится впервые**

Требования данной общей фармакопейной статьи распространяются на фармацевтические субстанции, представленные настойками, настойками гомеопатическими матричными, экстрактами жидкими, а также на лекарственные препараты, представленные в жидких лекарственных формах (настойки, экстракты, растворы спиртовые и др.), содержащие в своем составе спирт этиловый. Испытание по данному показателю в лекарственных средствах осуществляют только на стадии производственного процесса.

Метанол и 2-пропанол могут быть определены двумя методами: парофазной газовой хроматографией (метод 1) и газовой хроматографией (метод 2).

Предельно допустимое содержание метанола и 2-пропанола в лекарственных средствах должно составлять не более 0,05 % для метанола и не более 0,05 % для 2-пропанола, если нет других указаний в фармакопейной статье и/или нормативной документации.

Метод 1. Парофазная газовая хроматография

1. Раствор внутреннего стандарта

1,0 мл СО пропанола помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Затем отбирают 1,0

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

2. Испытуемый раствор

В мерную колбу вместимостью 20 мл помещают 4,0 мл анализируемого лекарственного средства, 1,0 мл раствора внутреннего стандарта, затем доводят объем раствора водой до метки, перемешивают и (при необходимости) фильтруют через мембранный фильтр 0,45.

3. Раствор сравнения А

1,0 мл метанола и 1,0 мл раствора СО 2-пропанола помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Затем отбирают 1,0 мл полученного раствора, помещают в мерную колбу вместимостью 20 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

4. Раствор сравнения Б

5,0 мл безводного этанола помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой до метки, перемешивают. 25,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой до метки, перемешивают. 1,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 20 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

5. Раствор сравнения В

В мерную колбу вместимостью 20 мл помещают 1,0 мл раствора внутреннего стандарта, 2,0 мл раствора сравнения (А) и 2,0 мл раствора сравнения (Б), доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Если нет других указаний в фармакопейной статье, определение проводят методом парофазной газовой хроматографии.

Хроматографические условия

Колонка:	30,0 м × 0,53 мм, кварцевое стекло с поли [(цианопропил) (фенил)] [диметил] силоксаном, 3 мкм;
Газ-носитель:	гелий;
Скорость потока:	3 мл/мин;
Деление потока:	1:50;
Детектор:	пламенно-ионизационный;
Объем пробы:	1,0 мл.

Условия для парофазного пробоотборника:

Температура уравновешивания:	85 °С;
Время уравновешивания:	20 мин.

Температурный режим:

	Время, мин	Температура (°С)
Колонка	0–1,6	40
	1,6–9,9	40→65
	9,9–13,6	65→175
	13,6–20,0	175
Блок ввода проб		200
Детектор		200

Хроматографируют испытуемый раствор и раствор сравнения В.

Относительные времена удерживания компонентов: этанол – 1 (около 5,3 мин): метанол – около 0,8, 2-пропанол – 1,2; пропанол – около 1,6.

Пригодность хроматографической системы с использованием раствора сравнения В определяется в соответствии с ОФС «Хроматография» со следующим уточнением:

- *разрешение (R)* между пиками метанола и этанола должно быть не менее 5;
- *фактор ассиметрии* пика (A_S) каждого компонента должен быть от 0,8 до 1,5.

Содержание метанола в объемных процентах (X, %) в испытуемом лекарственном средстве вычисляют по формуле:

$$X(\%) = \frac{S_1 \cdot S_2'}{S_2 \cdot S_1' \cdot 40},$$

где S_1 – площадь пика метанола на хроматограмме испытуемого раствора;

S_2 – площадь пика метанола на хроматограмме раствора сравнения В;

S_1' – площадь пика внутреннего стандарта на хроматограмме испытуемого раствора;

S_2' – площадь пика внутреннего стандарта на хроматограмме раствора сравнения В.

Содержание 2-пропанола в объемных процентах (X, %) в испытуемом лекарственном средстве вычисляют по формуле:

$$X(\%) = \frac{S_3 \cdot S_2'}{S_4 \cdot S_1' \cdot 40},$$

где S_3 – площадь пика 2-пропанола на хроматограмме испытуемого раствора;

S_4 – площадь пика 2-пропанола на хроматограмме раствора сравнения В;

S_1' – площадь пика внутреннего стандарта на хроматограмме испытуемого раствора;

S_2' – площадь пика внутреннего стандарта на хроматограмме раствора сравнения В.

Метод 2. Газовая хроматография

1. Раствор внутреннего стандарта

1,0 мл СО пропанола помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

2. Испытуемый раствор

В мерную колбу вместимостью 20 мл помещают 4,0 мл анализируемого лекарственного средства, 1,0 мл раствора внутреннего стандарта, доводят объ-

ем раствора водой до метки, перемешивают и (при необходимости) фильтруют через мембранный фильтр 0,45.

3. Раствор сравнения А

1,0 мл метанола и 1,0 мл 2-пропанола помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Затем отбирают 1,0 мл полученного раствора, помещают в мерную колбу вместимостью 20 мл, доводят объем раствора водой до метки, перемешивают.

4. Раствор сравнения Б

1,0 мл безводного этанола помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора водой до метки, перемешивают.

5. Раствор сравнения В

В мерную колбу вместимостью 20 мл помещают 1,0 мл раствора внутреннего стандарта, 2,0 мл раствора сравнения (А) и 1,0 мл раствора сравнения (Б), доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Если нет других указаний в фармакопейной статье, определение проводят методом газовой хроматографии.

Хроматографические условия:

Колонка:	30,0 м × 0, 53 мм, кварцевое стекло с поли [(цианопропил) (фенил)] [диметил] силоксаном, 3 мкм;
Газ-носитель:	гелий;
Скорость потока:	3 мл/мин;
Деление потока:	1:50;
Детектор:	пламенно-ионизационный;
Объем пробы:	1,0 мкл.

Температурный режим:

	Время, мин	Температура (°С)
Колонка	0–1,6	40

	1,6–9,9	40→65
	9,9–13,6	65→175
	13,6–20,0	175
Блок ввода проб		200
Детектор		200

Хроматографируют испытуемый раствор и раствор сравнения В.

Относительные времена удерживания компонентов: этанол - 1 (около 5,3 мин); метанол – около 0,8; 2-пропанол – 1,2; пропанол – около 1,6.

Пригодность хроматографической системы с использованием раствора сравнения В определяется в соответствии с ОФС «Хроматография» со следующим уточнением:

- *разрешение (R)* между пиками метанола и этанола должно быть не менее 5;
- *фактор ассиметрии* пика (A_S) каждого компонента должен быть от 0,8 до 1,5.

Содержание метанола в объемных процентах (X, %) в испытуемом лекарственном средстве вычисляют по формуле:

$$X(\%) = \frac{S_1 \cdot S_2'}{S_2 \cdot S_1' \cdot 40},$$

где S_1 – площадь пика метанола на хроматограмме испытуемого раствора;

S_2 – площадь пика метанола на хроматограмме раствора сравнения В;

S_1' – площадь пика внутреннего стандарта на хроматограмме испытуемого раствора;

S_2' – площадь пика внутреннего стандарта на хроматограмме раствора сравнения В.

Содержание 2-пропанола в объемных процентах (X, %) в испытуемом лекарственном средстве вычисляют по формуле:

$$X(\%) = \frac{S_3 \cdot S_2'}{S_4 \cdot S_1' \cdot 40},$$

где S_3 – площадь пика 2-пропанола на хроматограмме испытуемого раствора;

S_4 – площадь пика 2-пропанола на хроматограмме раствора сравнения В;

S_1’ – площадь пика внутреннего стандарта на хроматограмме испытуемого раствора;

S_2’ – площадь пика внутреннего стандарта на хроматограмме раствора сравнения В.

Определение *N,N*-диметиланилина **ОФС.1.2.3.0025.18**

Вводится впервые

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на определение примеси *N,N*-диметиланилина в фармацевтических субстанциях.

Определение проводят методом газовой хроматографии.

Раствор внутреннего стандарта. Около 50 мг (точная навеска) *N,N*-диэтиланилина помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют растворяют в 4,0 мл 0,1 М хлористоводородной кислоты и доводят объём раствора водой до метки. 1,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят объём раствора водой до метки.

Испытуемый раствор. Около 0,5 г (точная навеска) испытуемой субстанции помещают в колбу Эрленмейера с пришлифованной пробкой вместимостью 50 мл, растворяют в 30 мл воды и прибавляют 1,0 мл раствора внутреннего стандарта. Прибавляют 1,0 мл 40 % раствора натрия гидроксида и перемешивают до полного растворения. Прибавляют 2,0 мл триметилпентана. Встряхивают в течение 2 мин и выдерживают до разделения слоёв. Используют верхний слой.

Раствор сравнения. Около 50 мг (точная навеска) *N,N*-диметиланилина помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 4,0 мл 0,1 М хлористоводородной кислоты и доводят объём раствора водой до метки. 1,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят объём раствора водой до метки. 1,0 мл полученного раствора помещают в колбу Эрленмейера с пришлифованной пробкой

вместимостью 50 мл, прибавляют 30 мл воды, 1,0 мл раствора внутреннего стандарта, 1,0 мл 40 % раствора натрия гидроксида и 2,0 мл триметилпентана. Встряхивают в течение 2 мин и выдерживают до разделения слоёв. Используют верхний слой.

Хроматографические условия

<table>
<tr><td>Колонка</td><td colspan="3">Кварцевая капиллярная 30 м × 0,32 мм, покрытая поперечносшитым полиметилфенилсилоксаном, толщина слоя 0,5 мкм</td></tr>
<tr><td>Детектор</td><td colspan="3">пламенно-ионизационный</td></tr>
<tr><td>Газ-носитель</td><td colspan="3">гелий для хроматографии</td></tr>
<tr><td>Деление потока</td><td colspan="3">1:20</td></tr>
<tr><td>Давление в инжекторе</td><td colspan="3">50 кПа</td></tr>
<tr><td>Поток на сброс</td><td colspan="3">20 мл/мин</td></tr>
<tr><td>Объём пробы</td><td colspan="3">1 мкл</td></tr>
<tr><td rowspan="5">Температура</td><td rowspan="3">Колонка</td><td>Первые 5 мин</td><td>150 °С</td></tr>
<tr><td>Повышение со скоростью 20 °С/мин</td><td>до 275 °С</td></tr>
<tr><td>Выдерживание 3 мин</td><td>275 °С</td></tr>
<tr><td>Инжектор</td><td colspan="2">220 °С</td></tr>
<tr><td>Детектор</td><td colspan="2">300 °С</td></tr>
</table>

Времена удерживания: N,N-диметиланилин – около 3,6 мин; *N,N*-диэтиланилин – около 5,0 мин.

Определение 2-Этилгексановой кислоты **ОФС.1.2.3.0026.18**

Вводится впервые

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на определение примеси 2-этилгексановой кислоты в фармацевтических субстанциях.

Определение проводят методом ГХ.

Раствор внутреннего стандарта. Около 0,10 г (точная навеска) 3-циклогексилпропионовой кислоты помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в циклогексане и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

Испытуемый раствор. К около 0,30 г (точная навеска) испытуемой субстанции прибавляют 4,0 мл раствора хлористоводородной кислоты концентрированной. Энергично взбалтывают в течение 1 мин с 1,0 мл раствора внутреннего стандарта. Выдерживают до разделения фаз (при необходимости центрифугируют для лучшего разделения). Используют верхний слой.

Раствор сравнения. Около 75 мг (точная навеска) 2-этилгексановой кислоты помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в растворе внутреннего стандарта и доводят объём раствора тем же растворителем до метки. К 1,0 мл полученного раствора прибавляют 4,0 мл раствора хлористоводородной кислоты концентрированной. Энергично взбалтывают в течение 1 мин. Выдерживают до разделения фаз (при

необходимости центрифугируют для лучшего разделения). Используют верхний слой.

Хроматографические условия

Колонка	макрокапиллярная из плавленого кварца длиной 10 м и внутренним диаметром 0,53 мм, покрытая макрогол 20 000 2-нитротерефталатом (толщина слоя 1,0 мкм)
Детектор	пламенно-ионизационный
Газ-носитель	гелий
Скорость потока	10 мл/мин
Объем пробы	1 мкл

Температурная программа

	Время, мин	Температура, °С	Скорость, °С/мин	Режим
Колонка	0–2	40	–	Изотермический
	2–7,3	40 → 200	30	Линейный градиент
	7,3–10,3	200	–	Изотермический
Инжектор		200		
Детектор		300		

Пригодность хроматографической системы: на хроматограмме раствора сравнения разрешение между пиками 2-этилгексановой кислоты (1-ый пик) и внутреннего стандарта должно быть не менее 2,0.

Содержание 2-этилгексановой кислоты в процентах (*X*) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S_1 \cdot I_0 \cdot a_0 \cdot 2}{S_0 \cdot I_1 \cdot a_1}$$

где S_1 – площадь пика 2-этилгексановой кислоты на хроматограмме

испытуемого раствора;

S_0 – площадь пика 2-этилгексановой кислоты на хроматограмме раствора сравнения;

I_1 – площадь пика внутреннего стандарта на хроматограмме испытуемого раствора;

I_0 – площадь пика внутреннего стандарта на хроматограмме раствора сравнения;

a_1 – навеска субстанции, взятая для приготовления испытуемого раствора, г;

a_0 – навеска 2-этилгексановой кислоты, взятая для приготовления раствора сравнения, г.

Никель	**ОФС.1.2.3.0027.18**
в полиолах	**Вводится впервые**

Определение никеля проводят методом атомно-абсорбционной спектрометрии, в соответствии с ОФС «Атомно-абсорбционная спектрометрия» (метод II, метод стандартных добавок).

Испытуемый раствор. 20,0 г испытуемого вещества растворяют в смеси равных объемов уксусной кислоты разведенной и воды, доводят объем раствора этой же смесью растворителей до 100,0 мл и перемешивают.

Прибавляют 2,0 мл насыщенного раствора (около 10 г/л) аммония пирролидиндитиокарбомата и 10,0 мл метилизобутилкетона и встряхивают в течение 30 с в защищенном от света месте. Оставляют до расслоения. Для испытания используют слой метилизобутилкетона.

Эталонные растворы. Готовят три эталонных растворааналогично испытуемому раствору, но сдобавлением к 20,0 г испытуемого вещества соответственно 0,5 мл, 1,0 мл и 1,5 мл никеля эталонного раствора (10 ‰ Ni).

Методика

Устанавливают нулевую точку на приборе, используя метилизобутилкетон, обработанный аналогично испытуемому раствору, но без добавления испытуемого вещества. Измеряют поглощение при длине волны 232,0 нм, используя в качестве источника излучения лампу с полым никелевым катодом и воздушно-ацетиленовое пламя.

Испытуемое вещество должно содержать не более 1 ‰ никеля, если нет других указаний в нормативной документации.

Биологические испытания инсулина

ОФС.1.2.4.0001.15

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на следующие лекарственные средства: генноинженерные препараты человеческого инсулина и его аналоги, а также стандартные образцы для этих препаратов.

Биологические испытания основаны на способности инсулина человеческого и его аналогов снижать уровень глюкозы в крови животных и включают:

- определение биологической активности инсулина и его аналогов (показатель «Биологическая активность»);
- определение биоидентичности (показатель «Подлинность. Биоидентичность»);
- определение пролонгированного действия (показатель «Пролонгированное действие»).

1.ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Показатель «Биологическая активность» отражает гипогликемическое действие инсулина и его аналогов. Метод, в соответствии с которым выполняют данный показатель, позволяет количественно определить уровень

глюкозы в крови животных. Определение биологической активности является обязательным для оценки качества препаратов человеческого инсулина, его аналогов и стандартных образцов при регистрации, изучении стабильности, отработке новых производственных технологий и аттестации стандартных образцов.

Показатель «Биоидентичность» представляет собой упрощенный вариант метода определения биологической активности инсулина и его аналогов и является полуколичественным. Данный тест применяют для подтверждения подлинности препарата с использованием меньшего количества животных, чем при определении биологической активности. Применение показателя «Биоидентичность» возможно только для препаратов инсулина и его аналогов, обращающихся на фармацевтическом рынке не менее пяти лет с момента введения в медицинскую практику, если за этот период отсутствовали претензии к качеству данных препаратов.

Испытания по показателям «Биологическая активность» и «Биоидентичность» основаны на сопоставлении гипогликемического действия испытуемого образца (ИО) с гипогликемическим действием стандартного образца (СО) инсулина или соответствующих СО его аналогов.

«Пролонгированное действие» - показатель качества, который характеризует продолжительность гипогликемического эффекта ИО инсулина и его аналогов во времени.

2. ИСПЫТАНИЯ

Испытания по показателям «Биологическая активность» и «Биоидентичность» проводят на кроликах и мышах, содержащихся на стандартном рационе с соблюдением санитарных правил вивария. В опытах используют по две дозы (малую и большую) рабочих растворов ИО и СО, которые вводят подкожно в холку. Эти дозы подбирают в зависимости от чувствительности животных, рекомендуемое соотношение доз 1:2.

При биологических испытаниях инсулина и его аналогов допускается многократное использование животных. После проведенного испытания

кроликов можно использовать не ранее чем через 3 недели, а мышей - через 7 дней.

2.1. Биологическая активность инсулина и его аналогов

Биологическую активность субстанций инсулина, его лекарственных форм и аналогов определяют одним из 2 методов по снижению концентрации глюкозы в крови:

- кроликов (метод А);
- мышей (метод В).

2.1.1. Метод А. Определение биологической активности инсулина и его аналогов по снижению концентрации глюкозы в крови кроликов

Испытания проводят на кроликах породы Шиншилла массой не менее 2,5 кг, которых рандомизируют на 4 группы, не менее 6 животных в каждой. За 18 - 20 ч до эксперимента животных лишают корма, а перед началом испытания убирают воду.

Непосредственно перед экспериментом из основных растворов ИО и СО готовят по два рабочих раствора (примечание 1 и 2). Рекомендуемые концентрации рабочих растворов ИО и СО - 1,0 и 2,0 МЕ/мл, если в частных статьях не указаны иные концентрации.

Каждая группа животных получает рабочие растворы ИО и СО в порядке, предусмотренном схемой двойного перекреста (Таблица). Первой и второй группе животных подкожно вводят рабочие растворы СО в объёме 0,5 мл на животное (дозы малая - s_1 и большая - s_2), а третьей и четвертой группе - такой же объём рабочих растворов ИО (малая - u_1 и большая - u_2 доза). Вторую постановку теста («перекрест») проводят не ранее чем через неделю после первой.

Таблица

Схема двойного перекреста (последовательность введения рабочих растворов животным)

Испытание	ГРУППА 1	ГРУППА 2	ГРУППА 3	ГРУППА 4
I ПОСТАНОВАКА (день I)	s_1	s_2	u_1	u_2
II ПОСТАНОВКА (день II)	u_2	u_1	s_2	s_1

Взятие крови осуществляют трижды: непосредственно перед введением испытуемых растворов и через 1 и 2,5 ч после инъекций СО и ИО. Пробы крови из краевой вены уха, примерно по 50 мкл, отбирают в микроцентрифужные пробирки объемом 0,5 мл, содержащие 10 мкл раствора гепарина (5000 МЕ/мл). Концентрацию глюкозы в крови животных определяют согласно разделу 4. Из опыта исключают животных, которые отвечают судорогами на введение инсулина и тех, у которых снижение концентрации глюкозы в крови составляет менее 15 % по отношению к исходному уровню.

При вычислении биологической активности в качестве ответа кролика принимают:

– сумму двух концентраций глюкозы в крови через 1 ч и 2,5 ч после инъекции

или

– среднюю величину, на которую снижается концентрация глюкозы в крови в пробах, полученных после введения рабочего раствора СО и ИО инсулина у каждого животного и выражают ее в процентах по отношению к исходной.

Результаты опыта обрабатывают согласно ОФС «Статистическая обработка результатов определения специфической фармакологической активности лекарственных средств биологическими методами», подраздел 3.6 «Обработка результатов двойного перекреста (на примере биологической активности инсулина методом А и В)».

2.1.2. Метод В. Определение биологической активности инсулина по снижению концентрации глюкозы в крови мышей.

В опыт берут не менее 40 мышей одного пола массой не менее 20,0 г. Животных рандомизируют по массе на 4 группы не менее 10 животных в каждой.

Внутри группы каждую особь нумеруют по порядку. Во время опыта животным должен быть обеспечен свободный доступ к корму и воде.

Непосредственно перед экспериментом из основных растворов СО и ИО готовят по два рабочих раствора (Примечания 1, 2). Рекомендуемые концентрации рабочих растворов, например для самок, могут находиться в диапазоне 0,06 – 3,0 МЕ/мл. При испытании некоторых аналогов инсулина возможно использование более низких концентраций рабочий растворов. Например, 0,03-0,06 МЕ/мл.

Согласно схеме двойного перекреста (Таблица), мышам первой и второй группы подкожно в холку вводят по 0,1 мл/10 г массы тела животного рабочие растворы СО, а третьей и четвертой - такие же объёмы рабочих растворов ИО. Рабочие растворы последовательно вводят каждому животному, в соответствии с нумерацией, через каждые 15 - 20 с. Интервал между введениями рабочих растворов каждой группе животных должен составлять 1-2 мин.

Вторую постановку теста (перекрест) проводят через 24 ч после первой.

После инъекции инсулина через 40 ± 1 мин последовательно в соответствии с номером каждого животного внутри группы из орбитального венозного синуса глаза с помощью стерильного гепаринизированного капилляра берут около 50 мкл крови в микроцентрифужные пробирки объемом 0,5 мл. Необходимо соблюдать те же временные интервалы, что и при введении растворов. Определение концентрации глюкозы в крови животных проводят согласно разделу 4.

Результаты опыта обрабатывают согласно ОФС «Статистическая обработка результатов определения специфической фармакологической активности лекарственных средств биологическими методами», подраздел 3.6 «Обработка результатов двойного перекреста (на примере биологической активности инсулина методом А и В)».

2.1.3. Биоидентичность

Испытание и обработку результатов проводят так же как в подразделах ***2.1.1.*** и ***2.1.2*** со следующими изменениями:

1. В опыт берут 8 кроликов по 2 в каждой группе (метод А) или 24 мыши по 6 в каждой группе (метод В).

2. Не вычисляют доверительные границы величины биологической активности.

Метод является полуколичественным. Препарат считают прошедшим испытание, если его биологическая активность составляет не менее 56% от ожидаемой.

3. Пролонгированное действие лекарственных препаратов инсулина и его аналогов

В опыт берут не менее 18 кроликов одного пола, массой не менее 2,5кг. Животных рандомизируют по массе на 2 равные группы. За 18-20 ч до испытания кроликов лишают корма, оставляя свободный доступ к воде.

Одной группе животных подкожно вводят основной раствор СО, а другой - неразведенный ИО (Примечание 1). Концентрация СО должна быть равна концентрации неразведенного препарата.

Рекомендуемый диапазон доз составляет 0,5 - 0,8 МЕ/кг. Вводимые объемы рассчитывают, исходя из выбранной дозы, массы животного и количества МЕ в образце инсулина/аналога. Например, если, выбрана доза 0,5 МЕ/кг, а масса кролика 3,0 кг, то животному необходимо ввести 1,5 МЕ

инсулина, в объёме, который рассчитывается следующим образом. Для инсулина с активностью 100 МЕ в 1 мл (1000 мкл), вводимый объем составляет (1000мкл/100МЕ) × 0,5МЕ/кг × 3,0 кг = 15 мкл. Подобным образом рассчитывают объем, который вводят кролику с учётом массы и активности препарата.

Взятие крови проводят непосредственно перед инъекцией, а также через 1,5; 3,0; 4,5 и 6,0 ч после неё. Процедура взятия крови описана в разделе 2.1.1. (метод А). Определение концентрации глюкозы в крови животных проводят согласно разделу 4.

За контрольную временную точку принимают момент времени, в котором через 4,5 – 6 ч после инъекции средняя концентрация глюкозы в крови животных, получивших основной раствор СО, приблизится к 100±15% от исходного уровня. В этой точке для каждого кролика рассчитывают индивидуальную концентрацию глюкозы в крови в процентах относительно исходного уровня для данного животного.

Лекарственное средство считают прошедшим испытание, если в контрольной временной точке у животных, получивших его, средняя относительная концентрация глюкозы в крови, рассчитанная из индивидуальных концентраций, достоверно ниже, чем у животных, получивших основной раствор СО. Достоверность различия проверяют с помощью критерия Стьюдента при доверительной вероятности P = 0,95.

Результаты опыта обрабатывают согласно ОФС «Статистическая обработка результатов определения специфической фармакологической активности лекарственных средств биологическими методами», подраздел 3.8 «Обработка результатов испытания на пролонгированное (удлиненное) действие лекарственных препаратов инсулина и его аналогов».

4. Определение концентрации глюкозы в плазме животных

Для определения концентрации глюкозы в плазме кроликов и мышей рекомендуется применять глюкозооксидазный метод с использованием многоканального фотоэлектроколориметра.

После каждого взятия крови пробы центрифугируют в течение 5 мин при температуре 5°С и при величине относительного центробежного ускорения (ОЦУ), равной 1500 g (Примечание 3). От каждой пробы отбирают, например, по 10 мкл плазмы и переносят в микрокювету плоскодонного 96-луночного планшета, который можно хранить при температуре от 6 до 8°С до окончания испытания.

Перед определением концентрации глюкозы в каждую микрокювету с плазмой добавляют по 240 мкл готового энзимо-хромогенного набора, например, реактива «GLUCOSE Liquicolor» или аналогичного. Планшеты инкубируют при температуре (37 ± 1) °С не менее 20 мин.

Измерение оптической плотности проводят при длине волны 492 нм. В качестве раствора сравнения используют стандартный раствор глюкозы с концентрацией 5,55 ммоль/л (100 мг %), входящий в состав готового энзимо-хромогенного набора.

Концентрацию глюкозы (с) в крови рассчитывают по формуле:

$$c = \frac{A}{A_0} * 100 мг\%, \text{ где}$$

А - оптическая плотность пробы;

A_0 - оптическая плотность глюкозы в растворе сравнения.

Примечание 1

Приготовление основных растворов СО и ИО инсулина или его аналога.
Навеску СО инсулина растворяют в 0,2 мл 0,1 М раствора хлористоводородной кислоты до полного растворения субстанции, а затем добавляют растворитель для получения раствора с концентрацией инсулина 100 МЕ/мл. В качестве растворителя используют 0,1 М раствор кислоты хлористоводородной, разведенной в 33,3 раза раствором натрия хлорида 0,9% для инъекций.

Основной раствор следует хранить при температуре от 2 до 8°С. Замораживание не допускается. Раствор должен быть прозрачным.

При определении биологической активности субстанции инсулина основной раствор готовят таким же образом, что и основной раствор СО. Разведение субстанции проводят, исходя из величины биологической активности инсулина с учетом фактического содержания влаги.

Применение других растворителей возможно, при наличии указания на их использование в нормативной документации на аналоги инсулина. Основные и рабочие растворы аналогов инсулина готовят, как указано, если в нормативной документацмм на препарат, не указаны иные концентрации и условия.

Примечание 2

Приготовление рабочих растворов ИО и СО. Рабочие растворы, для получения требуемых концентраций СО и ИО, готовят из основных растворов непосредственно перед испытанием, добавляя соответствующие объемы того же растворителя, который был использован для приготовления основных растворов СО и ИО.

При определении биологической активности в лекарственных препаратах инсулина, представляющих суспензию, ИО осторожно взбалтывают и отбирают 1,0 мл, к которому для полного растворения суспензии добавляют 0,2мл 0,1М раствора хлористоводородной кислоты. В случае, если исходная концентрация ИО равна l00 МЕ/мл, то полученный раствор будет иметь концентрацию 83,3 МЕ/мл. В дальнейшем раствор используют для приготовления рабочих растворов ИО.

Примечание 3

Расчет скорости вращения ротора центрифуги.

Величина ОЦУ зависит от радиуса ротора центрифуги и скорости его вращения. Скорость вращения v (об/мин) ротора для обеспечения необходимой величины ОЦУ (в данном случае 1500 g) вычисляют по следующей формуле:

$$v = \sqrt{\frac{1500}{r \cdot 11.18 \cdot 10^{-6}}}$$, где

r - радиус ротора центрифуги;

$11{,}18 \cdot 10^{-6}$ – константа

Микробиологическая чистота **ОФС.1.2.4.0002.18**

Взамен ОФС 1.2.4.0002.15

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на методы определения микробиологической чистоты в нестерильных лекарственных средствах (НЛС), в том числе в биологических лекарственных средствах (БЛС), содержащих живые микроорганизмы, а также вспомогательные вещества и полупродукты. Кроме того, указанные методы используются при определении эффективности антимикробных консервантов и мониторинге производственных помещений фармацевтических предприятий и отдельных лабораторий.

НЛС (фармацевтические субстанции, различные лекарственные формы препаратов - таблетки, капсулы, гранулы, растворы, суспензии, сиропы, мази, суппозитории и др.), а также вспомогательные вещества могут быть контаминированы микроорганизмами. В НЛС, а также во вспомогательных веществах, допускается лимитированное количество микроорганизмов при отсутствии определенных видов, представляющих опасность для здоровья человека.

1. Рекомендуемые требования к качеству лекарственных средств

В Таблицах 1 и 2 приведены требования к качеству лекарственных средств (препаратов и фармацевтических субстанций), а также

вспомогательных веществ, используемых в производстве лекарственных препаратов.

Таблица 1- Микробиологическая чистота лекарственных препаратов

Категория	**Препараты**	**Рекомендуемые требования**
1	Лекарственные препараты (ЛП), в том числе биологические лекарственные препараты (БЛП), к которым предъявляется требование «Стерильность»	Препараты должны быть стерильными
2	• Для применения местно (на слизистую рта, десны и др.), наружно (на неповрежденные кожные покровы), интравагинально • Для введения в полости уха, носа • Респираторно (для ингаляций) • Трансдермальные пластыри За исключением тех лекарственных препаратов, которые должны быть стерильными	• Общее число аэробных микроорганизмов – не более 10^2 КОЕ в 1 г (мл) препарата или на 1 пластыре (включая клейкую сторону и основу) • Общее число дрожжевых и плесневых грибов – не более 10^1 КОЕ в 1 г (мл) или на 1 пластыре (включая клейкую сторону и основу) • Отсутствие *Pseudomonas aeruginosa* в 1 г (мл) препарата или на 1 пластыре (включая клейкую сторону и основу) • Отсутствие *Staphylococcus aureus* в 1 г (мл) препарата или на 1 пластыре (включая клейкую сторону и основу) • Отсутствие энтеробактерий, устойчивых к желчи, в 1 г (мл) препаратов, используемых респираторно • Отсутствие *Candida albicans* в 1 г (мл) интравагинальных препаратов
3	А. Для приема внутрь или введения ректально За исключением тех ЛП, которые должны быть стерильными	
	Твердые (неводные) препараты для приема внутрь	• Общее число аэробных микроорганизмов – не более 10^3 КОЕ в 1 г • Общее число дрожжевых и плесневых грибов – не более 10^2 КОЕ в 1 г • Отсутствие *Escherichia coli* в 1 г
	Препараты для введения ректально	• Общее число аэробных микроорганизмов – не более 10^3 КОЕ в 1 г (мл) • Общее число дрожжевых и плесневых грибов – не более 10^2 КОЕ в 1 г (мл)

	Жидкие препараты для приема внутрь	•Общее число аэробных микроорганизмов – не более 10^2 КОЕ в 1 г (мл) • Общее число дрожжевых и плесневых грибов – не более 10^1 КОЕ в 1 г (мл) • Отсутствие *Escherichia coli* в 1 г (мл)
	Б. Для приема внутрь – из сырья природного происхождения (животного, растительного или минерального), уровень микробной загрязненности которого невозможно снизить в процессе предварительной обработки. Исключением являются лекарственные растительные средства и БЛП, содержащие живые микроорганизмы, относящиеся к категориям 4 и 5	• Общее число аэробных микроорганизмов – не более 10^4 КОЕ в 1 г (мл) • Общее число дрожжевых и плесневых грибов – не более 10^2 КОЕ в 1 г (мл) • Энтеробактерий, устойчивых к желчи, – не более 10^2 КОЕ в 1 г (мл) • Отсутствие *Escherichia coli* в 1 г (мл) • Отсутствие бактерий рода *Salmonella spp.*в 10 г (мл) • Отсутствие *Staphylococcus aureus* в 1 г (мл)
4	Лекарственные растительные препараты и лекарственное растительное сырье	
	А. Применяемые в виде настоев и отваров, приготовленных с использованием кипящей воды	• Общее число аэробных микроорганизмов - не более 10^7 КОЕ в 1 г • Общее число дрожжевых и плесневых грибов – не более 10^5 КОЕ в 1 г • *Escherichia coli* – не более 10^2 КОЕ в 1 г • Отсутствие бактерий рода *Salmonella* в 25 г
	Б. Приготовленные без использования кипящей воды	• Общее число аэробных микроорганизмов - не более 10^5 КОЕ в 1 г • Общее число дрожжевых и плесневых грибов – не более 10^4 КОЕ в 1г • Энтеробактерий, устойчивых к желчи, - не более 10^3 КОЕ в 1 г • Отсутствие *Escherichia coli* в 1 г • Отсутствие бактерий рода *Salmonella* в 25 г
5	БЛП, содержащие живые микроорганизмы	
5.1. Вакцины		
	А. Для инъекций и накожного скарификационного (нанесения)	Не допускается присутствие микроорганизмов-контаминантов (определение проводят в соответствии с ОФС «Вакцины и анатоксины»)
	Б. Для внутрикожного введения и накожного скарификационного (нанесения), полученные с использованием живых животных, в случае если уровень микробной загрязненности невозможно снизить в процессе предварительной обработки	• Общее число аэробных бактерий, дрожжевых и плесневых грибов – не более 50 КОЕ в 1 мл • Отсутствие бактерий семейства *Enterobacteriaceae* в 1 мл • Отсутствие *Pseudomonas aeruginosa* в 1 мл • Отсутствие *Staphylococcus aureus* в 1 мл

	В. Для приема внутрь	• Общее число аэробных микроорганизмов - не более 10^3 КОЕ в единице препарата (г) • Общее число дрожжевых и плесневых грибов - менее 10 КОЕ в единице препарата (г) • Отсутствие бактерий семейства *Enterobacteriaceae* в единице препарата (г) • Отсутствие *Pseudomonas aeruginosa* в единице препарата (г) • Отсутствие *Staphylococcus aureus* в единице препарата (г)
5.2. Бактериофаги		
	А. Растворы для приема внутрь и ректально	Не допускается присутствие микроорганизмов-контаминантов (определение проводят в соответствии с ОФС «Стерильность»)
	Б. Для приема внутрь (таблетки), местно и наружно (мазь)	• Общее число аэробных бактерий - не более 10^2 КОЕ в 1 г • Общее число дрожжевых и плесневых грибов - менее 10 КОЕ в 1 г • Отсутствие бактерий семейства *Enterobacteriaceae* в 1 г • Отсутствие *Pseudomonas aeruginosa* в 1 г • Отсутствие *Staphylococcus aureus* в 1 г
5.3. Пробиотики		
	А. Для приема внутрь, интравагинально (лиофилизаты, суспензии, порошки)	• Отсутствие аэробных бактерий в единице препарата/г(мл) • Отсутствие дрожжевых и плесневых грибов в единице препарата/г(мл) • Для колисодержащих препаратов – отсутствие в единице препарата (г) БОЕ бактериофага (для препаратов с содержанием *Escherichia coli* не менее 10^{10} КОЕ допускается не более 10 БОЕ бактериофага в одной дозе)
	Б. Для приема внутрь, интравагинально, ректально (таблетки, капсулы, суппозитории и т.д.)	• Общее число аэробных бактерий - не более 10^2 КОЕ в единице препарата (г) • Общее число дрожжевых и плесневых грибов – менее 10 КОЕ в единице препарата (г) • Отсутствие *Candida albicans* в единице препарата (г) для интравагинальных препаратов • Отсутствие бактерий семейства *Enterobacteriaceae* в единице препарата (г) • Отсутствие *Pseudomonas aeruginosa* или бактерии рода *Proteus* в единице препарата (г)

		• Отсутствие *Staphylococcus aureus* в единице препарата (г) • Для колисодержащих препаратов – отсутствие в единице препарата (г) БОЕ бактериофага (для препаратов с содержанием *Escherichia coli* не менее 10^{10} КОЕ допускается не более 10 БОЕ бактериофага в одной дозе)
6	БЛП, содержащие инактивированные микроорганизмы, аллергены, антигены, антитела, белки, пептиды, гликопротеины и др.	
	6.1. БЛП, содержащие инактивированные микроорганизмы	
	А. Для приема внутрь, интраназально	• Общее число аэробных микроорганизмов – не более 50 КОЕ в 1 г (мл) • Общее число дрожжевых и плесневых грибов - менее 10 КОЕ в 1 г (мл) • Отсутствие энтеробактерий, устойчивых к желчи, в 1 г (мл) • Отсутствие *Escherichia coli* в 1 г (мл) • Отсутствие бактерий рода *Salmonella* в 1 г (мл) • Отсутствие *Pseudomonas aeruginosa* в 1 г (мл) • Отсутствие *Staphylococcus aureus в* 1 г (мл)
	Б. Для введения ректально	• Общее число аэробных микроорганизмов - не более 10^2 КОЕ в 1 г • Общее число дрожжевых и плесневых грибов - менее 10 КОЕ в 1 г • Отсутствие бактерий семейства *Enterobacteriaceae* в 1 г • Отсутствие *Pseudomonas aeruginosa* в 1 г • Отсутствие *Staphylococcus aureus* в 1 г
	6.2. Аллергены	
	А. Для инъекций и накожного скарификационного (нанесения)	Препараты должны быть стерильными
	Б. Для приема в полости рта	• Общее число аэробных микроорганизмов - не более 10^2 КОЕ в 1 г (мл) • Общее число дрожжевых и плесневых грибов – не более 10 КОЕ в 1 г (мл) • Отсутствие *Escherichia coli* в 1 г (мл) • Отсутствие *Pseudomonas aeruginosa* в 1 г (мл) • Отсутствие *Staphylococcus aureus* в 1 г (мл)
	6.3. БЛП, содержащие антигены, антитела, белки, пептиды, гликопротеины и др.	
	А. • Для применения местно, наружно, интравагинально, респираторно, в полости носа	• Общее число аэробных микроорганизмов - не более 10^2 КОЕ в 1 г (мл) • Общее число дрожжевых и плесневых грибов – не более 10 КОЕ в 1 г (мл)

	• Для приема в полости рта	• Отсутствие энтеробактерий, устойчивых к желчи, в 1 г (мл) • Отсутствие *Pseudomonas aeruginosa* в 1 г (мл) • Отсутствие *Staphylococcus aureus* в 1 г (мл) • Отсутствие *Candida albicans* в 1 г (мл) интравагинальных препаратов
	Б. Для приема внутрь или введения ректально	• Общее число аэробных микроорганизмов – не более 10^3 КОЕ в 1 г (мл) • Общее число дрожжевых и плесневых грибов – не более 10^2 КОЕ в 1 г (мл) • Отсутствие *Escherichia coli* в 1 г (мл)

Таблица 2 - Микробиологическая чистота фармацевтических субстанций и вспомогательных веществ для производства лекарственных препаратов

Категория	**Фармацевтические субстанции, вспомогательные вещества**	**Рекомендуемые нормы**
1.2	Фармацевтические субстанции для производства	
	А. Стерильных лекарственных препаратов, которые не подвергаются стерилизации	Субстанции должны быть стерильными
	Б. – Стерильных лекарственных препаратов, которые подвергаются стерилизации в упаковке; – Стерильных лекарственных препаратов, при производстве/изготовлении которых для обеспечения стерильности используется стерилизующая фильтрация; – Нестерильных лекарственных препаратов, относящихся к категории 2 (см. табл. 1)	• Общее число аэробных микроорганизмов- не более 10^2 КОЕ в 1 г (мл) • Общее число дрожжевых и плесневых грибов – не более 10^1 КОЕ в 1 г (мл) • Отсутствие энтеробактерий, устойчивых к желчи, в 1 г (мл) • Отсутствие *Pseudomonas aeruginosa* в 1 г (мл) • Отсутствие *Staphylococcus aureus* в 1 г (мл)
2.2	Субстанции синтетического происхождения для производства нестерильных лекарственных препаратов	• Общее число аэробных микроорганизмов - не более 10^3 КОЕ в 1г (мл) • Общее число дрожжевых и плесневых грибов – не более 10^2 КОЕ в 1 г (мл) • Отсутствие *Escherichia coli* в 1 г (мл)
3.2	Субстанции природного происхождения (растительного, животного или минерального) для производства нестерильных лекарственных препаратов	• Общее число аэробных микроорганизмов - не более 10^4 КОЕ в 1г (мл) • Общее число дрожжевых и плесневых грибов – не более 10^2 КОЕ в 1г (мл) • Отсутствие *Escherichia coli* в 1г (мл) • Отсутствие бактерий рода *Salmonella* в

		25 г (мл) • Отсутствие *Pseudomonas aeruginosa* в 1 г (мл) • Отсутствие *Staphylococcus aureus* в 1 г (мл) • Энтеробактерий, устойчивых к желчи, - не более 10^2 КОЕ в 1 г (мл)
4.2	Вспомогательные вещества (мука пшеничная, крахмал, тальк и т.д.)	• Общее число аэробных микроорганизмов - не более 10^3 КОЕ в 1 г (мл) • Общее число дрожжевых и плесневых грибов – не более 10^2 КОЕ в 1 г (мл) • Отсутствие *Escherichia coli* в 1г (мл) • Отсутствие бактерий рода *Salmonella* в 25 г (мл) • Отсутствие *Pseudomonas aeruginosa* в 1 г (мл) • Отсутствие *Staphylococcus aureus* в 1 г (мл) • Энтеробактерий, устойчивых к желчи, - не более 10^2 КОЕ в 1 г (мл)
5.2	Субстанции для производства биологических лекарственных препаратов (БЛП):	
	А. Стерильных БЛП, которые не подвергаются стерилизации	Субстанции должны быть стерильными
	Б. – Стерильных лекарственных препаратов, которые подвергаются стерилизации в упаковке; – Стерильных лекарственных препаратов, при производстве/изготовлении которых для обеспечения стерильности используется стерилизующая фильтрация	• Общее число аэробных микроорганизмов – не более 10^2 КОЕ в 1 г (мл) • Общее число дрожжевых и плесневых грибов - менее 10 КОЕ в 1 г (мл) • Отсутствие энтеробактерий, устойчивых к желчи в 1 г (мл) • Отсутствие *Pseudomonas aeruginosa* в 1 г (мл) • Отсутствие *Staphylococcus aureus* в 1 г (мл)
	В. Субстанции для производства БЛП, содержащие живые микроорганизмы: – в которых не допускаются микроорганизмы-контаминанты (живые вакцины (инъекционные препараты), бактериофаги, растворы для приема внутрь и ректально); – в которых лимитируются микроорганизмы-контаминанты (живые вакцины для приема внутрь, бактериофаги)	Не допускается присутствие микроорганизмов-контаминантов определение проводят в соответствии с ОФС «Стерильность», ОФС «Вакцины и анатоксины» и ФС или нормативной документацией)

	Г. Для производства пробиотиков, в которых допускаются микроорганизмы-контаминанты (таблетки, капсулы, суппозитории)	• Отсутствие посторонних аэробных бактерий в 1 г • Отсутствие дрожжевых и плесневых грибов в 1 г

Примечания к Таблицам 1 и 2

1. В нормативных документах могут быть указаны в виде исключения и другие нормы в зависимости от состава ЛС и особенностей технологического процесса их производства.

2. В нормативных документах на препараты для детей могут быть введены более строгие нормы, а именно:
- в 1 г (мл) препаратов для детей (от 0 до 1 года) - не более 50 аэробных бактерий и дрожжевых и плесневых грибов (суммарно) (для БЛП – «Общее количество аэробных микроорганизмов - не более 50 КОЕ в 1 г (мл); общее число дрожжевых и плесневых грибов – менее 10 КОЕ в 1 г (мл)»), при отсутствии энтеробактерий, устойчивых к желчи*, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus;*
- в 1 г (мл) препаратов для детей (старше 1 года) - не более 500 аэробных микроорганизмов и 50 дрожжевых и плесневых грибов при отсутствии энтеробактерий, устойчивых к желчи, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus.*

3. В нормативных документах на БЛП – пробиотики для детей должны быть введены более строгие нормы, а именно:
- для детей (от 3 месяцев до 1 года) для приема внутрь (таблетки, капсулы и др.), ректально (суппозитории) - не более 10 аэробных бактерий-контаминантов в 1 единице препарата/г; при отсутствии в 1 единице препарата бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa,* бактерии рода *Proteus, Staphylococcus aureus* и дрожжевых и плесневых грибов;
- для детей (от 1 года) для приема внутрь (таблетки, капсулы), ректально (суппозитории) - не более 50 аэробных бактерий-контаминантов в 1 г препарата; при отсутствии в 1 единице препарата бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa,* бактерии рода *Proteus, Staphylococcus aureus,* дрожжевых и плесневых грибов.
4. При обнаружении во время проведения испытания других патогенных микроорганизмов, кроме указанных выше, считают, что качество лекарственных средств, субстанций и вспомогательных веществ не соответствует требованиям по показателю «Микробиологическая чистота».
5. К категориям 1.2.Б и 5.2.Б могут быть отнесены термолабильные субстанции, которые используются в производстве стерильных лекарственных препаратов, не подвергающихся стерилизации в окончательной упаковке. Такие субстанции не могут быть подвержены

термической стерилизации ввиду особенностей их строения и физико-химических свойств. В этом случае, в процессе производства лекарственного препарата допускается использование стерилизующей фильтрации раствора субстанции или раствора субстанции со вспомогательными веществами. Стерилизующую фильтрацию проводят согласно ОФС «Стерилизация».

Испытание микробиологической чистоты лекарственных средств проводят в асептических условиях с помощью приведенных ниже методов и питательных сред.

Испытание включает способы подготовки различных лекарственных форм препаратов и фармацевтических субстанций, отбор образцов для анализа, методы количественного определения жизнеспособных микроорганизмов, выявление и идентификацию отдельных видов бактерий, наличие которых недопустимо или ограничено в лекарственных средствах, а также питательные среды, растворы и реактивы, необходимые для проведения испытаний.

Для инкубации посевов на питательных средах для бактерий стандартной температурой является (32,5 ± 2,5) ^{o}C, для грибов – (22,5 ± 2,5) ^{o}C.

2. Работа с тест-штаммами микроорганизмов

Для проведения испытания (определение антимикробного действия ЛС, качества питательных сред, биохимического тестирования выделенных микроорганизмов) необходимо использовать тест-штаммы микроорганизмов, депонированные в официальных отечественных и зарубежных коллекциях, например:

- Государственной коллекции патогенных микроорганизмов (ГКПМ), Россия;
- Российской коллекции патогенных грибов (РКПГ);
- Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ) РАН, Россия;
- Американской коллекции типовых культур (ATCC), США;
- Национальной коллекции типовых культур (NCTC), Великобритания;
- Коллекции культур института Пастера (CIP), Франция.

- Институт гигиены и эпидемиологии (IHE), Прага, Чехия

Тест-штаммы микроорганизмов, используемые в испытаниях, приведены в табл. 3.

Таблица 3 – Тест-штаммы микроорганизмов, используемых в испытаниях

Название микроорганизма	Номер штамма
Bacillus subtilis	ГКПМ 010011, ATCC 6633, NCTC 10400, DSM 347
Bacillus cereus	ГКПМ 010014, ATCC 10702, NCTC 8035, DSM 487
Escherichia coli	ГКПМ 240533, ATCC 25922, ATCC 8739, NCTC 12923, NCTC 12241, DSM 1103, CIP 53.126
Salmonella enterica subsp. *enterica* serovar *abony* (прежнее название *Salmonella abony)*	ГКПМ 100329, IHE 103/39, NCTC 6017, CIP 80.39
Pseudomonas aeruginosa	ГКПМ 190155, ATCC 9027, NCTC 12924, CIP 82.118
Staphylococcus aureus	ГКПМ 201108, ATCC 6538, NCTC 10788
Staphylococcus epidermidis	ГКПМ 202001, ATCC 14990 ГКПМ 202004, ATCC 12228
Candida albicans	ГКПМ 303903, ГКПМ 303901, РКПГУ401/NCTC 885-653, ATCC 10231, NCPF 3179
Aspergillus brasiliensis (прежнее название *Aspergillus niger*)	ВКМ F1119,ATCC 9642, ATCC 16404, NCPF2275 РКПГF106

Кроме перечисленных в табл. 3 тест-штаммов микроорганизмов, возможно использование и других культур, типичных по морфологическим, тинкториальным и биохимическим свойствам.

Набор тест-микроорганизмов может быть уменьшен или увеличен в случае необходимости.

Тест-микроорганизмы в лиофилизированном виде в ампулах, в пробирках на полужидком агаре хранят при температуре 2 – 8 ^{o}C. Культуры микроорганизмов на дисках хранят при температуре не выше минус 20 ^{o}C в

случае отсутствия информации по хранению от фирмы-производителя дисков.

Допускается не более 5 пассажей от исходной культуры.

Могут быть использованы готовые к применению коммерческие системы, представляющие собой субстраты, содержащие определенное количество микробных клеток.

2.1. Активация лиофилизированных тест-штаммов микроорганизмов

Тест-штаммы микроорганизмов лиофилизированные, в ампулах, получают из официальных коллекций с сертификатом соответствия (паспортом штамма).

Ампулы вскрывают в асептических условиях в соответствии с инструкцией производителя.

Для восстановления жизнеспособности культуры необходимо не менее 2 пересевов на питательной среде, соответствующей биологическим свойствам штамма, при инкубации в оптимальных для данного штамма температурных условиях. Для получения изолированных колоний тест-штамма проводят пересев на соответствующую плотную питательную среду.

После окончания инкубации культуры изучают морфологию выросших колоний, микроскопируют мазки, окрашенные по Граму, изучают биохимические свойства с использованием тест-систем, разрешенных к использованию. Тест-штамм микроорганизма должен обладать типичными морфологическими, тинкториальными, биохимическими свойствами в соответствии с представленными сертификатами коллекции.

После подтверждения свойств тест-штамма культуру пересевают на соответствующую питательную среду (первый пассаж) и инкубируют в стандартных условиях.

Для получения конидий *A. brasiliensis* культуру выращивают на агаре Сабуро с глюкозой (или среде № 2) в течение 5 – 7 сут в стандартных условиях.

2.2. Активация тест-штаммов микроорганизмов, хранящихся на дисках

Диск помещают в жидкую питательную среду, соответствующую потребностям данного микроорганизма. После инкубации в соответствующих условиях совершают те же операции и в той же последовательности, как при активации лиофилизированной культуры.

2.3. Хранение тест-штаммов при глубокой заморозке

Хранение тест-штаммов микроорганизмов в условиях глубокой заморозки осуществляется при температуре минус (70 ± 5) °С (криосистема). Криосистема состоит из набора плотно закрытых пробирок, содержащих керамические бусы, погруженных в специфическую криожидкость, и свинцового криоблока с ячейками. Работу с тест-штаммами проводят в полном соответствии с рекомендациями производителя криосистемы.

3. Определение антимикробного действия

Во избежание неправильной оценки полученных результатов перед испытанием на микробиологическую чистоту необходимо определить возможность проявления лекарственным средством антимикробного действия в отношении определенных видов микроорганизмов.

В основе метода определения антимикробного действия лежит сравнение интенсивности роста тест-штаммов микроорганизмов в присутствии и без испытуемого препарата.

3.1. Приготовление инокулята

24-часовые бульонные культуры бактерий, выращенные на соево-казеиновом бульоне или среде № 8, и 24–48-часовую культуру *C. albicans,* выращенную на жидкой среде Сабуро (соево-казеиновом бульоне или среде № 8), разводят стерильным 0,9 % раствором натрия хлорида 1:1000 (*B. cereus,*

C. albicans) и 1:100000 (*E. coli, S. abony*, *P. aeruginosa, S. aureus*) до концентрации около 10^4 КОЕ/мл.

Взвесь спор *B.subtilis* также разводят до концентрации 10^4 КОЕ в 1 мл.

Культуру *A. brasiliensis* со скошенного агара Сабуро с глюкозой или со среды № 2 смывают 0,9 % раствором натрия хлорида с 0,05 % раствором твина-80. Определяют количество конидий в 1 мл смыва, используя камеру Горяева или чашечный агаровый метод, и разводят до концентрации 10^4 конидий в 1 мл.

3.2. Подготовка образца для определения антимикробного действия

К образцу ЛС добавляют подходящий разбавитель для получения разведения 1:10. В качестве разбавителя используют, как правило, фосфатный буферный раствор с натрия хлоридом и пептоном (pH 7,0), нейтрализующую жидкость или буферный раствор, содержащий не более 5 % твина-80. Из разведения 1:10 готовят последовательные разведения 1:50, 1:100, 1:500, 1:1000 и т.д.

3.3. Методы определения антимикробного действия

Испытание на наличие антимикробного действия проводят одним из описанных ниже методов.

3.3.1. Определение антимикробного действия в условиях испытания на микробиологическую чистоту

Каждое разведение испытуемого препарата в количестве 1 мл вносят в 6 чашек Петри диаметром 90 мм, в 2 из которых прибавляют по 0,2 мл взвеси *B. cereus* (или спор *B .subtilis*), в 2 другие – по 0,2 мл рабочей взвеси культуры *C. albicans*, в 2 последние – 0,2 мл взвеси конидий *A. brasiliensis.* Чашки с бактериями заливают 10 – 15 мл расплавленного и охлажденного до (42,5 ± 2,5) ^{o}C соево-казеинового агара или среды № 1, чашки с культурами грибов – тем же количеством агара Сабуро или среды № 2.

По 1,0 мл каждого разведения препарата вносят в пробирки с 10 мл жидких сред – бульона Мосселя (бульона Мак-Конки, среды №3) и соево-

казеинового бульона (среда № 8). Затем по 1 мл взвеси тест-штаммов *E. coli, S. abony, P. aeruginosa, S. aureus* (каждый штамм отдельно) вносят в пробирку со средой, соответствующей потребностям микроорганизма.

В контрольные чашки и пробирки вместо разведений препарата вносят такое же количество растворителя.

Посевы инкубируют в стандартных условиях в течение 48 ч для бактерий и 5 сут – для грибов.

3.3.2. Метод репликаций

Метод репликаций рекомендуется использовать для определения антимикробного действия водонерастворимых (суспензии, эмульсии и др.) или окрашенных лекарственных средств.

В стерильные чашки Петри вносят по 1 мл каждого разведения исследуемого препарата. В контрольные чашки вносят по 1 мл разбавителя, используемого для получения разведений. В чашки Петри, как в эксперименте, так и в контроле, добавляют по 10 – 15 мл расплавленного и охлажденного до температуры (42,5 ± 2,5) ^{o}C соево-казеинового агара или среды № 1, в другие – такое же количество агара Сабуро или среды № 2 и тщательно перемешивают. После застывания агара чашки подсушивают в термостате или ламинарном шкафу для удаления конденсата с поверхности среды, на которую затем бактериологической петлей, пипеткой или репликатором наносят рабочую взвесь каждого тест-штамма бактерий и грибов в виде бляшек. Посевы на средах инкубируют в стандартных условиях в течение 48 ч для бактерий и 5 сут – для грибов.

3.4. Учет и интерпретация результатов

После окончания времени инкубации просматривают посевы и отмечают появление типичного роста тест-микроорганизмов в контрольных чашках и пробирках (без препарата) и испытуемых (с различными разведениями препарата). В случаях, затрудняющих учет результатов

(помутнение или изменение окраски жидкой среды в результате взаимодействия ЛС с питательной средой), делают пересевы на агаризованные среды.

При наличии роста *E. coli, S. abony, P. aeruginosa, S. aureu*s на питательных средах делают вывод об отсутствии антимикробного действия исследуемого препарата.

Наличие в испытуемых чашках и пробирках роста тест-микроорганизмов, аналогичного контрольным, обозначают знаком «+», отсутствие роста – знаком «–». Если на средах с препаратом наблюдают уменьшение количества колоний на чашках или отсутствие роста тест-микроорганизмов, делают заключение о наличии у него антимикробного действия. Первое из последовательных разведений препарата, в котором отсутствует антимикробное действие, используют для посева на соответствующую питательную среду.

3.5. Способы устранения антимикробного действия ЛС

Для устранения антимикробного действия ЛС рекомендованы следующие методы:

- увеличение разведения препарата за счет большего объема разбавителя или питательной среды в пределах норм допустимой микробной загрязненности (в качестве разбавителя вместо стандартного фосфатного буферного раствора используют нейтрализующую жидкость (п. 9) лабораторного или промышленного изготовления);
- применение специфических инактиваторов (например, использование β-лактамазы для некоторых β-лактамных антибиотиков и *пара*-аминобензойной кислоты (ПАБК) – для сульфаниламидных препаратов), нейтрализующих антимикробное действие препарата, но не угнетающих рост микроорганизмов, контаминирующих ЛС;
- использование неспецифических инактиваторов для препаратов с консервантами. После проведения валидации в буферный раствор и (или) в

питательные среды могут быть добавлены твин-80, соевый или яичный лецитин и др.;

- для препаратов, растворимых в воде или в изопропилмиристате (ИПМ), применяется метод мембранной фильтрации с последующим промыванием фильтров.

3.5.1. Инактивация некоторых антибиотиков

Для инактивации пенициллинов и цефалоспоринов, независимо от их лекарственной формы, в буферный раствор, используемый для растворения, суспендирования или эмульгирования образца, а также в питательные среды перед их использованием асептически вносят стерильный раствор β-лактамазы в количестве, указанном в нормативных документах.

3.5.2.Инактивация сульфаниламидных препаратов

Для инактивации сульфаниламидных препаратов, независимо от их лекарственной формы, в буферный раствор, используемый для растворения, суспендирования или эмульгирования образца, а также в питательные среды, если необходимо, до стерилизации вносят ПАБК из расчета 0,05 г/л среды в случае, если антимикробное действие не удается устранить путем разведения.

3.5.3. Инактивация консервантов, входящих в состав ЛС

Для инактивации консервантов, входящих в состав ряда лекарственных средств, в буферный раствор, в котором эмульгируют образец, а также в питательные среды до стерилизации вносят следующие неспецифические инактиваторы: 3 % твина-80 или 0,3 % лецитина (яичного или соевого) от объема среды. В случае, если в препарате имеется более 2 консервантов различной химической структуры, в среду вносят 3 % твина-80, 0,3 % лецитина, 0,1 % L-гистидина и 0,5 % натрия серноватистокислого одновременно. Некоторые инактиваторы указаны в табл. 4.

Таблица 4 – Инактиваторы антимикробного действия ЛС

Химические соединения	Инактивирующие вещества или метод
Глутаровый альдегид, ртутьсодержащие соединения	гидросульфит натрия (бисульфит натрия)
Фенолы, спирты, альдегиды, сорбаты	разведение
Альдегиды	глицин
Четвертичные аммониевые соединения (ЧАС), бисбигуаниды, *пара*-гидроксибензоаты (парабены)	лецитин
ЧАС, йодсодержащие соединения, парабены	полисорбат, твин-80
Ртутьсодержащие соединения	тиогликолят
Ртутьсодержащие соединения, галогены, альдегиды	тиосульфат
Соли этилендиаминтетраацетата (ЭДТА)	ионы Mg(II) или Ca(II)

В случае, если при анализе качества ЛС нельзя использовать метод мембранной фильтрации, а все вышеперечисленные способы устранения его антимикробного действия в отношении конкретного тест-штамма микроорганизма неэффективны, этот вид испытания не проводят.

4. Отбор образцов ЛС

От каждой исследуемой серии ЛС для проведения испытания отбирают необходимое количество образцов в соответствии с категорией препарата из достаточного числа разных упаковок (не менее 3 – 10).

Для аэрозолей на основе жидких или твердых веществ отбирают 10 контейнеров, для трансдермальных пластырей – 10 пластырей.

В некоторых случаях (при высокой стоимости препарата и/или малом объеме серии) образец может быть уменьшен в отдельных случаях до 2 – 3 г (мл). Уменьшение количества образца с указанием метода испытания

должно быть обосновано и утверждено в нормативной документации в установленном порядке.

***4.1. Твердые лекарственные формы**:*

- 10,0 г образца – для определения общего числа аэробных микроорганизмов, дрожжевых и плесневых грибов в 1 г препарата, для испытания на отсутствие *P. aeruginosa, S. aureus*, *E. coli* и *C.albicans*;

- 10,0 г или 25,0 г образца – для определения бактерий рода *Salmonella*;

- 10,0 г образца – для количественного определения энтеробактерий, устойчивых к желчи.

4.1.1. Таблетки, драже, гранулы, порошки и др.

10,0 г образца измельчают (в случае необходимости) и добавляют 100 мл буферного раствора (нейтрализующей жидкости). Далее проводят количественное и качественное определение микроорганизмов.

4.1.2. Капсулы

10,0 г образца переносят в 100 мл буферного раствора (нейтрализующей жидкости), содержащего не более 5 % твина-80 и нагретого до температуры не выше (42,5±2,5) ^{o}C. После суспендирования капсул в буферном растворе проводят количественное и качественное определение микроорганизмов.

***4.2. Мягкие лекарственные формы**:*

10,0 г образца – для определения общего числа аэробных микроорганизмов, дрожжевых и плесневых грибов, для теста на отсутствие *P. aeruginosa, S. aureus, E. coli*, *C.albicans* в 1 г препарата

4.2.1. Мази, линименты, кремы, суппозитории, легко смешиваемые с водой

10,0 г образца помещают в стерильную колбу, содержащую 100 мл буферного раствора и стерильные стеклянные бусы диаметром 5 – 6 мм. Смесь нагревают на водяной бане до температуры не выше (42,5±2,5) ^{o}C и энергично встряхивают до получения гомогенной эмульсии, которую

используют для количественного и качественного определения микроорганизмов.

4.2.2. Мази, линименты, кремы, суппозитории, трудно смешиваемые с водой

10,0 г образца смешивают со стерильным твином-80, количество которого не должно быть более 1/2 объема образца (в данном случае 5 г). Смесь нагревают на водяной бане или в термостате до температуры не выше (42,5±2,5) ^{o}C и осторожно перемешивают. Время нагрева не должно превышать 30 мин. Добавляют необходимое количество предварительно нагретого до соответствующей температуры стерильного фосфатного буферного раствора со стеклянными бусами. Смесь осторожно перемешивают для получения гомогенной эмульсии в разведении 1:10, которую используют для количественного и качественного определения микроорганизмов. Возможно использование других технических средств, методик гомогенизации с соблюдением правил асептики и режимов термостатирования.

***4.3. Жидкие лекарственные формы**:*

- 10,0 г (мл) образца – для определения общего числа аэробных микроорганизмов, дрожжевых и плесневых грибов в 1 мл препарата, для теста на отсутствие *E. coli, P. aeruginosa, S. aureus, C.albicans*;

- 10,0 или 25,0 г (мл) образца – для испытания на отсутствие бактерий рода *Salmonella*;

- 10,0 г (мл) образца – для количественного определения энтеробактерий, устойчивых к желчи.

4.3.1. Растворы, суспензии, сиропы, микстуры

Переносят 10,0 г образца в 100 мл (10,0 мл - в 90,0 мл) буферного раствора, перемешивают и проводят количественное и качественное определение микроорганизмов.

4.3.2. Растворы в маслах, эмульсии

Помещают 10,0 г (мл) образца в стерильную колбу, содержащую 100 (90) мл буферного раствора (нейтрализующую жидкость) с твином-80 в количестве не более 5 % и стеклянные бусы. Смесь нагревают на водяной бане до температуры (42,5±2,5) °С и энергично встряхивают до получения гомогенной эмульсии, которую используют для количественного и качественного определения микроорганизмов.

4.4. Аэрозоли

4.4.1. Аэрозоли на основе спиртов и твердых веществ

Переносят 3,0 г образца (после испарения пропеллента) в 30 мл буферного раствора, перемешивают и проводят количественное и качественное определение микроорганизмов. Не менее 1,0 г образца, применяемого респираторно, используют для испытания на отсутствие энтеробактерий, устойчивых к желчи.

4.4.2. Аэрозоли на основе масел

Переносят 3,0 г образца (после испарения пропеллента) в стерильную емкость с 30 мл буферного раствора с твином-80 в количестве не более 5 % и стерильные стеклянные бусы. Смесь нагревают на водяной бане до температуры (42,5±2,5) °С и энергично встряхивают до получения гомогенной эмульсии, которую используют для количественного и качественного определения микроорганизмов.

Не менее 1,0 г образца, применяемого респираторно, используют для испытания на отсутствие энтеробактерий, устойчивых к желчи.

4.5. Трансдермальные пластыри

При отборе трансдермальных пластырей используют образец, состоящий из 10 единиц. С каждого из 10 пластырей снимают защитную пленку, пользуясь стерильными инструментами. При необходимости пластырь разрезают стерильными ножницами на более мелкие фрагменты, которые переносят в колбу вместимостью 1000 мл, содержащую 500 мл стерильного буферного раствора и стеклянные бусы (условное разведение

1:50). Колбу нагревают на водяной бане до температуры (42,5±2,5) °С, энергично встряхивают в течение 30 мин.

Используют по 50 мл полученного смыва для количественного определения микроорганизмов методом мембранной фильтрации и испытания на отсутствие *P. aeruginosa и S. aureus.*

Если известно, что пластырь обладает антимикробным действием, в разбавитель добавляют подходящий инактиватор (твин-80 и/или лецитин).

В случае, если смыв с трансдермальных пластырей нельзя использовать для определения методом мембранной фильтрации, применяют метод прямого посева на питательные среды, используя разведение 1:50**.**

4.6. Лекарственные растительные препараты

К лекарственным растительным препаратам (ЛРП) относятся препараты, произведенные или изготовленные из одного вида лекарственного растительного сырья или нескольких видов такого сырья и реализуемые в расфасованном виде во вторичной (потребительской) упаковке (пачки, пакеты, брикеты и пр.).

От каждой контролируемой серии лекарственного растительного препарата отбирают объединенную пробу, из которой выделяют образец для определения микробиологической чистоты – минимум 3-5 невскрытых потребительских упаковок общей массой не менее 50 г.

Перед испытанием потребительские упаковки вскрывают с помощью стерильных инструментов, отбирают из них пробу в равных количествах, перемешивают и переносят в стерильную емкость.

Для количественного определения аэробных микроорганизмов и грибов образец массой 10,0 г (плоды, кора, корни и корневища, почки и др.) или 2,0 г (трава, листья, цветки и другие с большим коэффициентом водопоглощения) переносят в стерильную колбу. При массе образца 10,0 г в колбу помещают 100 мл стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида. Колбу с исследуемым образцом встряхивают на качалке или аппарате для встряхивания в течение не менее 15 мин. Полученный смыв считают

разведением 1:10. При массе образца 2,0 г в колбу добавляют 200 мл стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида. Полученный смыв считают разведением 1:100.

Если образец плохо смачивается, в колбу прибавляют поверхностно-активное вещество – стерильный твин-80 в количестве 0,1 % от объема раствора.

Из полученных смывов ЛРП, соответствующих разведениям 1:10 или 1:100, готовят последовательные десятикратные разведения в том же разбавителе. Количественное определение аэробных микроорганизмов проводят чашечным агаровым методом, как указано в разделе 5.

Испытание на отсутствие бактерий *E. coli, Salmonella* и энтеробактерий, устойчивых к желчи, выполняют в соответствии с методами, приведенными в разделе 6.

5. Методы количественного определения аэробных микроорганизмов

В зависимости от природы ЛС и его физико-химических свойств используют один из вариантов чашечного агарового метода (глубинный, двухслойный, поверхностный, модифицированный глубинный), метод мембранной фильтрации или пробирочный метод наиболее вероятных чисел.

5.1. Чашечные агаровые методы

Для культивирования микроорганизмов используют агаризованные питательные среды: соево-казеиновый агар или среду № 1 сухую для контроля микробной загрязненности – для выращивания бактерий, агар Сабуро с глюкозой или среду № 2 сухую для контроля микробной загрязненности – для выращивания дрожжевых и плесневых грибов.

Для каждого разведения образца используют не менее 2 чашек Петри с определенной средой.

5.1.1. Глубинный метод

В стерильную чашку Петри диаметром 90 мм вносят 1 мл испытуемого образца, приготовленного для анализа. Добавляют 15 – 20 мл расплавленной и охлажденной до температуры (42,5 ± 2,5) ^{o}C стерильной агаризованной

питательной среды и быстро перемешивают вращательными движениями. При большем диаметре чашек Петри количество среды соответственно увеличивают до 20 – 25 мл. После застывания агара чашки переворачивают и инкубируют посевы.

5.1.2. Двухслойный метод

Расплавленную агаризованную стерильную питательную среду вносят в количестве 15 – 20 мл в стерильную чашку Петри диаметром 90 мм и оставляют до застывания. При большем диаметре чашки Петри количество среды соответственно увеличивают. Поверхность агара в чашке подсушивают.

В пробирку с 4 мл соответствующей расплавленной и охлажденной до температуры (42,5 ± 2,5) °С питательной среды вносят 1 мл образца, приготовленного для анализа, быстро перемешивают содержимое пробирки. Затем содержимое пробирки выливают на поверхность застывшего и подсушенного агара в чашке Петри, равномерно распределяя верхний слой среды вращательными движениями. После застывания чашку переворачивают и помещают в термостат для инкубации.

5.1.3. Поверхностный метод

Расплавленные и охлажденные до температуры (42,5 ± 2,5) °С стерильные питательные среды вносят в количестве 15 – 20 мл в каждую стерильную чашку Петри диаметром 90 мм и оставляют до застывания. При большем диаметре чашек Петри количество среды соответственно увеличивают. Поверхность агара в чашках подсушивают в термостате или ламинарном шкафу.

Образец, приготовленный для анализа, наносят стерильной пипеткой на агар в количестве 0,1 мл и равномерно распределяют шпателем по поверхности среды.

Чашки переворачивают и помещают в термостат для инкубации.

5.1.4. Модифицированный глубинный метод

Образец, приготовленный для анализа, в количестве 1,0 мл вносят в стерильную чашку Петри диаметром 90 мм. Добавляют 7 – 10 мл расплавленной и охлажденной до температуры (42,5 ± 2,5) °С питательной среды и быстро перемешивают вращательными движениями. После застывания агара чашки переворачивают и инкубируют.

5.1.5. Учет и интерпретация результатов, полученных чашечными агаровыми методами

Посевы просматривают ежедневно. Предварительный подсчет колоний производят через 24 – 72 ч и фиксируют окончательный результат через 5 сут.

Для получения достоверных результатов отбирают чашки, в которых число колоний бактерий не превышает 250, а колоний грибов – 50. Если при учете результатов двух последующих разведений число колоний на чашках находится в указанных выше пределах, рассчитывают результаты из меньшего разведения.

Если в среднем на чашках выросло более 250 колоний бактерий или более 50 колоний грибов, делают ряд дальнейших последовательных разведений образца, выбирая приемлемое для посева значение.

Если на соево-казеиновом агаре (или на среде № 1) дополнительно обнаружены колонии грибов, то их суммируют с числом бактерий и определяют общее число аэробных микроорганизмов.

Если на питательной среде отсутствует рост микроорганизмов, результаты отмечают в протоколе испытания следующим образом: при посеве ЛС в разведении 1:10 – «В 1 г (или в 1 мл) лекарственного средства содержится менее 10 бактерий (или грибов)»; при посеве ЛС в разведении 1:100 – «В 1 г (или в 1 мл) лекарственного средства содержится менее 100 бактерий (или грибов)» и т.д.

Количество микроорганизмов *(N)* в 1 г или в 1 мл рассчитывают по формуле:

$$N = \frac{\sum c}{n} \cdot d \cdot 10,$$

где: c – количество колоний на всех чашках Петри;

n – число чашек Петри;

d – коэффициент разведения образца;

10 – коэффициент пересчета при проведении высева на чашку в объеме 0,1 мл.

*Пример***.** При посеве 1,0 мл образца из разведения 10^{-2} на 2 чашках выросло 168 и 215 колоний:

$$N = \frac{168 + 215}{2} \cdot 10^2 = 191{,}50 \cdot 10^2 = 1{,}9 \cdot 10^4.$$

Полученный результат округляют до 2 значащих цифр – 19000 и записывают как $1{,}9 \cdot 10^4$ колониеобразующих единиц (КОЕ).

Примечание.

В связи с тем, что ЛРП, представляющие собой лекарственные растения или их части (листья, цветки, трава, плоды, семена, кора, корни, корневища и др.), являются неоднородными в отношении количества аэробных микроорганизмов, дрожжевых и плесневых грибов, нормы их допустимой микробной загрязненности интерпретируют следующим образом, например:

- если количество микроорганизмов в 1 г не более 10^5 КОЕ – максимально допускается $5 \cdot 10^5$ КОЕ/г;
- если количество микроорганизмов в 1 г не более 10^7 КОЕ – максимально допускается $5 \cdot 10^7$ КОЕ/г и т.д.

Для остальных категорий лекарственных средств нормы допустимой микробной загрязненности (независимо от метода: прямой посев или мембранная фильтрация) интерпретируют следующим образом, например:

- если количество микроорганизмов в 1 г или в 1 мл не более 10^2 КОЕ – максимально допускается $2 \cdot 10^2$ КОЕ/г или мл;

– если количество микроорганизмов в 1 г или в 1 мл не более 10^3 КОЕ – максимально допускается $2 \cdot 10^3$ КОЕ и т.д.

Варианты чашечного агарового метода (глубинный, двухслойный и глубинный модифицированный) можно использовать при испытании различных лекарственных форм, независимо от уровня микробной загрязненности. Поверхностный агаровый метод предпочтительнее использовать при испытании ЛС с высоким уровнем микробной контаминации. Для сокращения сроков получения результатов количественного определения микроорганизмов, колонии которых склонны к сливному росту, используют модифицированный агаровый метод посева.

5.2. Метод мембранной фильтрации

Метод мембранной фильтрации используют для количественного и качественного определения микроорганизмов в ЛС, обладающих или не обладающих антимикробным действием, в частности для растворов и водорастворимых ЛС, а также для жиросодержащих препаратов, растворимых в изопропилмиристате (ИПМ).

5.2.1. Условия проведения испытания

Установка для мембранной фильтрации должна иметь конструкцию, из которой легко извлекается фильтр, с последующим его переносом на питательные среды. Используют мембранные фильтры с диаметром пор не более 0,45 мкм, способные эффективно задерживать микроорганизмы, что необходимо подтвердить валидацией. Материал мембраны следует выбирать таким образом, чтобы компоненты исследуемого препарата не влияли на эффективность его работы. Фильтры из нитрата целлюлозы используют для водных, масляных и разбавленных спиртовых растворов (менее 30 %), из ацетата целлюлозы – для спиртовых растворов (более 30 %), кислот, щелочей. Мембранную фильтрацию проводят в асептических условиях с помощью вакуума.

5.2.2. Выполнение испытания

Образец, как правило, растворяют в буферном растворе в соотношении 1:10. В воронку фильтровальной установки вносят сначала промывную жидкость (примерно 5 мл) для смачивания фильтра. Добавляют количество раствора препарата, соответствующее 1 г (мл) испытуемого образца, и немедленно фильтруют. В случае наличия антимикробного действия ЛС для отмывания мембраны используют 0,9 % раствор натрия хлорида или описанные ниже жидкости (№ 1, № 2, № 3), для чего через фильтр пропускают не менее 3 порций по 100 мл подходящей стерильной промывной жидкости. При необходимости к промывной жидкости могут быть добавлены поверхностно-активные вещества (например, твин-80) или инактиваторы антимикробного действия. Через 1 мембрану можно пропускать не более 500 мл промывной жидкости.

Допускается использование для отмывания мембран менее 3 порций промывной жидкости при условии валидации метода.

Для того чтобы определить, полностью ли отмыты мембраны от фильтруемого препарата, обладающего антимикробным действием, после фильтрации раствора в последнюю порцию промывной жидкости вносят по 1 мл взвеси тест-штаммов микроорганизмов культур, соответствующих категории испытуемого образца. Количество вносимого каждого в отдельности микроорганизма не должно превышать 100 КОЕ в 1 мл.

Рост тест-штаммов на фильтрах подтверждает отсутствие антимикробного действия лекарственного средства. В случае, если антимикробное действие сохраняется, используют специфические или неспецифические инактиваторы или увеличивают объем промывной жидкости.

Смыв с трансдермальных пластырей пропускают через мембранные фильтры по 50 мл (соответствует 1 пластырю) через каждую мембрану.

По окончании процесса фильтрации мембраны переносят на соответствующие питательные среды, разлитые в чашки Петри или флаконы

с жидкими питательными средами. Чашки с фильтрами переворачивают. Посевы на чашках и во флаконах инкубируют в стандартных условиях.

5.2.3. Учет и интерпретация результатов

Подсчет колоний производят через 48 – 72 ч (предварительные результаты) и через 5 сут (окончательные результаты). Отбирают чашки, в которых число колоний бактерий на фильтрах не превышает 100, а грибов – 50, и рассчитывают число микроорганизмов на 1,0 г (1,0 мл) образца или на 1 пластырь. Если на фильтре большее количество микроорганизмов, то делают ряд последовательных разведений образца и выбирают подходящее.

Учет результатов на жидких питательных средах проводят в соответствии с разделом 6.

5.2.4. Жидкости для промывания фильтров

Для промывания фильтров можно использовать любую стерильную жидкость, не подавляющую рост микроорганизмов:

- 0,9 % раствор натрия хлорида pH (7,0 ± 0,2) (после стерилизации);
- жидкость № 1: растворяют 1 г ферментативного пептона в 1000 мл воды очищенной, фильтруют или центрифугируют для осветления, разливают в сосуды и стерилизуют; pH (7,0 ± 0,2);
- жидкость № 2: добавляют 1 мл твина-80 к 1000 мл жидкости № 1, разливают во флаконы и стерилизуют. Величина pH после стерилизации (6,9 ± 0,2). Жидкость № 2 применяют, если в составе препарата имеется масло;
- жидкость № 3: растворяют 5 г мясного пептона, 3 г мясного экстракта и 10 г твина-80 в 1000 мл воды очищенной. Разливают во флаконы и стерилизуют; pH после стерилизации (6,9 ± 0,2).

5.3. Метод наиболее вероятных чисел (НВЧ)

Метод НВЧ используют при испытании ЛС с низким уровнем микробной контаминации, а также в тех случаях, когда нельзя применить другие методы. Метод НВЧ менее чувствителен и точен по сравнению с

чашечным агаровым методом или методом мембранной фильтрации, и его используют только для определения общего числа бактерий, так как результаты, полученные при определении общего числа грибов, особенно плесневых, считают недостоверными.

5.3.1. Выполнение испытания

Исследуемый образец готовят в виде раствора, суспензии или эмульсии в разведениях 1:10, 1:100, 1:1000, используя подходящий растворитель. Жидкую питательную среду разливают в 12 стерильных пробирок по 9 мл в каждой. Пробирки ставят в штатив в 4 ряда по 3 пробирки в ряду.

В первый ряд пробирок вносят по 1 мл испытуемого образца в разведении 1:10, во второй ряд – по 1 мл в разведении 1:100, в третий ряд – по 1 мл в разведении 1:1000. В пробирки четвертого ряда вносят по 1 мл разбавителя, который используют для растворения, суспендирования или эмульгирования образца. Посевы инкубируют в стандартных условиях в течение не более 3 сут.

5.3.2. Учет и интерпретация результатов

Отмечают число пробирок в первом, втором и третьем рядах, в которых визуально наблюдают рост микроорганизмов. Среда в пробирках четвертого ряда (контроль разбавителя) должна оставаться стерильной. Полученное трехзначное число соответствует наиболее вероятному количеству жизнеспособных микроорганизмов в 1,0 г или в 1,0 мл лекарственного средства (табл. 5).

Таблица 5 – Наиболее вероятное число микроорганизмов

Количество пробирок в каждом ряду, в которых наблюдают рост			НВЧ микроорганизмов в 1 г (мл) препарата
Количество препарата в пробирке, г (мл)			
0,1	**0,01**	**0,001**	
0	0	0	менее 3
0	0	1	3
0	1	0	3
0	1	1	6,1
0	2	0	6,2
0	3	0	9,4
1	0	0	3,6

1	0	1	7,2
1	0	2	11
1	1	0	7,4
1	1	1	11
1	2	0	11
1	2	1	15
1	3	0	16
2	0	0	9,2
2	0	1	14
2	0	2	20
2	1	0	15
2	1	1	20
2	1	2	27
2	2	0	21
2	2	1	28
2	2	2	35
2	3	0	29
2	3	1	36
3	0	0	23
3	0	1	38
3	0	2	64
3	1	0	43
3	1	1	75
3	1	2	120
3	1	3	160
3	2	0	93
3	2	1	150
3	2	2	210
3	2	3	290
3	3	0	240
3	3	1	460
3	3	2	1100
3	3	3	более 1100

*Пример***.** В первом ряду рост микроорганизмов наблюдается в 3 пробирках, во втором ряду – в 2 пробирках, в третьем ряду – в 1 пробирке. Полученное число "321" по табл. 5 соответствует цифре "150".

Следовательно, наиболее вероятное число бактерий в 1 г или 1 мл исследуемого образца – 150. Если учет результатов не может быть определен точно в связи с природой исследуемого препарата (помутнение среды, изменение ее цвета и т.п.), делают пересев на соответствующую жидкую или агаризованную среду, чтобы убедиться в наличии роста микроорганизмов.

6. Определение отдельных видов микроорганизмов

Испытание включает использование селективных и диагностических питательных сред.

6.1. Энтеробактерии, устойчивые к желчи

6.1.1 Испытание на отсутствие энтеробактерий, устойчивых к желчи (качественный метод)

Для восстановления жизнеспособности микроорганизмов используют предварительную инкубацию образца в жидкой питательной среде. С этой целью 10,0 г или 10,0 мл исследуемого образца переносят в 100 мл соево-казеинового бульона (или среды № 8), перемешивают и инкубируют при температуре (22,5 ± 2,5) ^{o}C в течение 2 ч, но не более 5 ч. После инкубации снова перемешивают содержимое флакона, в котором проводилось восстановление жизнеспособности микроорганизмов (гомогенат А), и переносят 10 мл (количество, соответствующее 1 г или 1 мл образца) в 100 мл среды обогащения (бульон Мосселя). Посевы инкубируют в течение 24 – 48 ч в стандартных условиях. При появлении роста делают пересев бактериологической петлей на агар Мосселя или среду № 4, которую инкубируют в течение 18 – 24 ч.

Если на агаре Мосселя или среде №4 (Эндо) выявлены типичные колонии энтеробактерий (табл.7), по морфологическим и тинкториальным свойствам представляющие собой грамотрицательные неспорообразующие палочки, не обладающие цитохромоксидазой (п.8.1), считают, что исследуемый образец контаминирован энтеробактериями, устойчивыми к желчи.

6.1.2. Количественное определение энтеробактерий, устойчивых к желчи.

Для посева используют 3 пробирки с 9 мл бульона Мосселя в каждой. Гомогенат А в количестве 1 мл (соответствует 0,1 г или 0,1 мл образца) вносят в первую пробирку, тщательно перемешивают и переносят 1 мл (соответствует 0,01 г или 0,01 мл образца) во вторую пробирку, снова перемешивают и переносят 1 мл (соответствует 0,001 г или 0,001 мл образца)

в третью пробирку, меняя пипетку после каждого шага. Посевы инкубируют в течение 24 – 48 ч.

Для подтверждения отсутствия энтеробактерий, устойчивых к желчи, делают пересев бактериологической петлей из каждой пробирки с видимым ростом на агар Мосселя (или среду № 4) и инкубируют чашки Петри в течение 18 – 24 ч. Проводят микроскопическое исследование обнаруженных на плотной среде колоний. Выявление грамотрицательных палочковидных неспорообразующих бактерий свидетельствует о присутствии в ЛС энтеробактерий, устойчивых к желчи. Наиболее вероятное количество энтеробактерий, устойчивых к желчи, в 1 г или 1 мл образца определяют по табл. 6.

Таблица 6 – Интерпретация результатов

Количество испытуемого образца			НВЧ бактерий в 1 г (мл) образца
0,1 г(мл)	0,01 г(мл)	0,001 г(мл)	
1 мл гомогената А	1 мл гомогената А в разведении 1:10	1 мл гомогената А в разведении 1:100	
+	+	+	более 10^3
+	+	-	от 10^2 до 10^3
+	-	-	от 10^1 до 10^2
-	-	-	менее 10^1

Обозначения: + – наличие роста; – отсутствие роста

6.2. Бактерии *Escherichia coli*

6.2.1. Испытание на отсутствие бактерий E. coli (качественный метод)

10 г (мл) исследуемого образца, растворенного или разбавленного стерильным фосфатно-буферным раствором или ином разбавителе 1:10, переносят в количестве 10 мл (соответствует 1 г или 1 мл испытуемого ЛС) в 100 мл соево-казеинового бульона (или среды № 8). Перемешивают и инкубируют в течение 18 – 24 ч. При наличии роста 1 мл содержимого флакона переносят в 100 мл бульона Мак-Конки (или среды № 3) и инкубируют 24 – 48 ч при температуре (43 ± 1) °С.

При обнаружении роста в бульоне бактериологической петлей делают пересев на агар Мак-Конки или среду № 4. Посевы инкубируют в течение 18 – 48 ч (агар Мак-Конки) или 18 – 24 ч (среда № 4) в стандартных условиях. Если после инкубации на плотных питательных средах выявлены колонии, типичные для *E. coli* (табл. 7), их микроскопируют. При обнаружении в мазках мелких грамотрицательных палочек отдельные типичные колонии пересевают в пробирки на скошенный соево-казеиновый агар или среду № 1 и инкубируют в течение 18 – 24 ч для накопления чистой культуры микроорганизма.

Для идентификации выделенных бактерий используют биохимические тесты на цитохромоксидазу (п.8.1), индол (п.8.2) и способность утилизировать натрия цитрат. Для этого из пробирок с чистой культурой делают пересевы на агар Симмонса (или среду № 14) и соево-казеиновый бульон. Через 18 – 24 ч инкубации отмечают рост бактерий или его отсутствие на агаре Симмонса (или среде № 14). Утилизацию цитрата устанавливают по смещению pH среды в щелочную сторону (изменению цвета среды с зеленого на синий). Наличие индола определяют по появлению красного кольца на поверхности соево-казеинового бульона (или среды № 15) при добавлении реактива Ковача.

Если в ходе исследования обнаруживают типичные грамотрицательные палочки, не содержащие фермент цитохромоксидазу, не утилизирующие натрия цитрат и образующие индол, считают, что ЛС контаминировано бактериями *E. coli*.

6.2.2. Количественное определение бактерий E. coli

Количественное определение *E.coli* проводят так же, как и количественное определение энтеробактерий, устойчивых к желчи (п. 6.1.2), делая пересев из гомогената А в пробирки с бульоном Мак-Конки (или средой № 3). При обнаружении роста в пробирках (табл. 7) из каждой пробирки делают пересев бактериологической петлей на агар Мак-Конки или среду № 4. Посевы инкубируют в стандартных условиях в течение 18 – 48 ч (агар Мак-Конки) или 18 – 24 ч (среда № 4).

При обнаружении на указанных средах типичных колоний бактерий (табл. 7), по морфологическим и тинкториальным свойствам представляющих собой грамотрицательные палочки, которые не содержат фермент цитохромоксидазу, не утилизируют натрия цитрат и образуют индол, делают вывод, что ЛС контаминировано бактериями *E. coli*. Наиболее вероятное количество клеток *E. coli* в 1 г или в 1 мл испытуемого образца определяют по табл. 6.

6.3. Испытание на отсутствие бактерий рода *Salmonella*

Переносят 10 (25) г или 10 (25) мл исследуемого образца в 90 (225) мл соево-казеинового бульона (или среды № 8), перемешивают и инкубируют в течение 18 – 24 ч. После перемешивания 0,1 мл переносят в 10 мл накопительного бульона для бактерий рода *Salmonella* – среду Раппопорта – Вассилиадиса и инкубируют в стандартных условиях в течение 18 – 24ч. По окончании инкубации делают пересев бактериологической петлей на одну из 2 плотных диагностических сред: ксилоза-лизин-дезоксихолат агар или висмут-сульфитный агар (среда № 5), которые затем инкубируют в течение 48 ч.

При выявлении на указанных средах колоний, типичных для бактерий рода *Salmonella* (табл. 7), проводят микроскопическое исследование. При обнаружении в мазках грамотрицательных палочек характерные колонии пересевают на скошенный трехсахарный агар с солями железа (или среду № 13), нанося большое количество культуры бактериологической петлей сначала на скошенную часть агара, а потом уколом в столбик, не касаясь дна пробирки. Через 24 ч инкубации в стандартных условиях отмечают изменение цвета среды из красного в желтый в основании столбика питательной среды (ферментация глюкозы). В скошенной части агара цвет среды не изменяется (отсутствие ферментации сахарозы и лактозы). Почернение среды свидетельствует об образовании сероводорода – типичном признаке большинства бактерий рода *Salmonella*. Параллельно проводят определение наличия фермента цитохромоксидазы (п.8.1), а также

другие биохимические и серологические тесты в случае необходимости дополнительного подтверждения.

Если в образце обнаружены бактерии, типичные по своим культуральным, морфологическим и тинкториальным свойствам (табл. 7), не содержащие фермент цитохромоксидазу, не ферментирующие сахарозу и лактозу и выделяющие сероводород, считают, что лекарственное средство контаминировано бактериями рода *Salmonella*.

6.4. Испытание на отсутствие бактерий *Pseudomonas aeruginosa*

Исследуемый образец, растворенный или разбавленный стерильным буферным раствором или иным разбавителем 1:10, переносят в количестве 10 мл (соответствует 1 г или 1 мл) в 100 мл жидкой питательной среды (соево-казеинового бульона или среды № 8). Перемешивают и инкубируют в стандартных условиях в течение 24 – 48 ч. После окончания инкубации при наличии роста производят пересев бактериологической петлей на селективную питательную среду для выделения синегнойной палочки (цетримидный агар или цетилпиридиний хлорид (ЦПХ) агар – среда № 16). Посевы инкубируют в стандартных условиях в течение 24 – 48 ч. Выделенные колонии микроорганизмов, которые по своим тинкториальным и морфологическим свойствам являются грамотрицательными палочками, пересевают на агар для выявления сине-зеленого пигмента пиоцианина (или среду № 9). Посевы инкубируют в течение 24 – 48 ч.

Для подтверждения видовой принадлежности выделенных бактерий к *P. aeruginosa* определяют наличие фермента цитохромоксидазы (п.8.1) и способность выделенных микроорганизмов расти на соево-казеиновом бульоне (или среде № 8) при температуре (42 ± 1) ^{o}C в течение 18 – 24 ч.

При испытании качества трансдермальных пластырей 10 пластырей помещают в 500 мл фосфатного буферного раствора и осторожно встряхивают в течение 30 минут при нагревании.

Полученную жидкость в количестве 50 мл пропускают через стерильный мембранный фильтр из нитрат-целлюлозы с диаметром пор 0,45

мкм, который затем переносят в 100 мл соево-казеинового бульона (или среды № 8). Посевы инкубируют в течение 24 – 48 ч. После инкубации при наличии роста производят пересев бактериологической петлей на селективные среды – цетримидный агар или ЦПХ-агар. Дальнейшую идентификацию проводят, как указано выше.

Если в образце обнаружены бактерии, типичные для псевдомонад по своим морфологическим и тинкториальным свойствам (табл. 7), образующие сине-зеленый пигмент пиоцианин, содержащие фермент цитохромоксидазу и растущие при температуре (42 ± 1) ^{o}C, считают, что ЛС контаминировано бактериями *P. aeruginosa*.

6.5. Испытание на отсутствие бактерий *Staphylococcus aureus*

Исследуемый образец, растворенный или разбавленный стерильным буферным раствором или иным разбавителем 1:10, переносят в количестве 10 мл (что соответствует 1 г или 1 мл образца) в 100 мл соево-казеинового бульона или среды № 8. Перемешивают и инкубируют в течение 24 – 48 ч. При наличии роста пересевают петлей на маннитно-солевой агар (или среду № 10) и инкубируют в стандартных условиях в течение 24 – 48 ч.

Появление после окончания инкубации типичных золотисто-желтых колоний (табл. 7), окруженных желтыми зонами на среде с маннитом, свидетельствует о росте *S. aureus,* ферментирующем маннит. Проводят микроскопическое исследование типичных колоний. При обнаружении в мазках грамположительных кокков, расположенных в виде виноградных гроздей, производят пересев на соево-казеиновый агар (или среду № 1). Инкубируют в стандартных условиях в течение 18 – 24 ч. Для идентификации проводят тест на наличие коагулазы (п.8.3).

При испытании микробиологической чистоты трансдермальных пластырей 10 пластырей помещают в 500 мл фосфатного буферного раствора и осторожно встряхивают в течение 30 минут при нагревании.

Полученную жидкость в объеме 50 мл пропускают через стерильный мембранный фильтр из нитрата целлюлозы с диаметром пор 0,45 мкм,

который затем переносят в 100 мл соево-казеинового бульона (или среды № 8) и инкубируют в течение 24 – 48 ч. После инкубации при наличии роста пересевают петлей на маннитно-солевой агар (или среду № 10) для выделения *S. aureus* . Посевы инкубируют в течение 48 ч.

Если в образце обнаружены типичные по культуральным, морфологическим и тинкториальным свойствам бактерии (табл. 7), содержащие коагулазу, утилизирующие маннит, считают, что ЛС контаминировано *S.aureus*.

6.6. Испытание на отсутствие грибов *Candida albicans*

Исследуемый образец, растворенный или разбавленный стерильным буферным раствором или иным разбавителем 1:10, переносят в количестве 10 мл (что соответствует 1 г или 1 мл образца) в 100 мл бульона Сабуро, перемешивают и инкубируют в течение 3 – 5 сут при температуре (32,5 ± 2,5)^{o}C. При наличии роста пересевают бактериологической петлей на агар Сабуро с глюкозой (или среду № 2) и инкубируют в течение 24 – 48 ч при той же температуре.

Рост белых круглых, выпуклых, гладких и блестящих колоний может указывать на наличие *Candida albicans*, что подтверждают в ходе дальнейшей идентификации, одним из этапов которой является микроскопическое исследование (окраска по Граму), выявляющее грамположительные дрожжеподобные почкующиеся овальные или округлые клетки размером 4 – 8 мкм. Для идентификации возможно использовать специальную среду, предназначенную для дифференциации *C. albicans* от других видов грибов рода *Candida*.

Если в образце обнаружены типичные по морфологическим и тинкториальным свойствам дрожжеподобные грибы (табл. 7), идентифицированные как *C. albicans*, считают, что ЛС контаминировано указанным видом грибов.

6.7. Культуральные, морфологические и тинкториальные свойства микроорганизмов

Характерные культуральные, морфологические и тинкториальные свойства некоторых микроорганизмов – возможных контаминантов ЛС представлены в табл. 7.

Таблица 7 – Культуральные, морфологические и тинкториальные свойства микроорганизмов-контаминантов

Питательные среды	Морфология колоний	Окраска по Граму
Escherichia coli		
Бульон Мак-Конки	Обесцвечивание среды, помутнение, газообразование	грамотрицательные палочки, не имеющие спор
Среда № 3	Изменение окраски среды, газообразование	
Агар Мак-Конки	Кирпично-красные колонии, могут быть окружены зонами выпавшей в осадок желчи	
Среда № 4	Малиновые или розовые колонии с металлическим блеском, окруженные зонами малинового цвета	
Агар Мосселя	Красные колонии, окруженные красными зонами преципитации	
Salmonella spp.		
Бульон Раппопорта – Вассилиадиса	Помутнение среды при сохранении цвета или отсутствие видимого роста	грамотрицательные палочки, не имеющие спор
Ксилоза-лизин-дезоксихолат агар	Красные колонии с черным центром или без него	
Висмут-сульфит агар (или среда № 5)	Черные колонии с антрацитовым блеском, среда под колониями черного цвета	
Агар Мосселя	Красные колонии, окруженные красными зонами преципитации	
Pseudomonas aeruginosa		
Соево-казеиновый бульон (среда № 8)	Помутнение, поверхностный рост в виде пленки	грамотрицательные палочки, не имеющие спор
Цетримидный агар	Зеленоватые колонии, зеленые в УФ свете	
Среда № 16 (ЦПХ-агар)	Зеленоватые колонии, зеленые в УФ свете	
Агар для выявления пиоцианина, среда № 9	Сине-зеленые колонии, сине-зеленые в УФ свете	
Staphylococcus aureus		
Соево-казеиновый бульон (среда №8)	Равномерное помутнение	грамположительные кокки в виде гроздей
Маннитно-солевой агар (или среда № 10)	Золотисто-желтые колонии, окруженные желтыми зонами	
Staphylococcus epidermidis		

Маннитно-солевой агар (или среда № 10)	Белые колонии, отсутствие желтых зон вокруг колоний	грамположитель-ные кокки в виде гроздей
Candida albicans		
Бульон Сабуро	Придонный рост	грамположитель-ные дрожжеподобные почкующиеся овальные или круглые клетки размером 4–8 мкм
Сабуро агар (среда № 2)	Белые, круглые, выпуклые, гладкие и блестящие колонии	

7. Повторение испытания

В случае необходимости при выявлении контаминации ЛС повторяют тот раздел испытания, результаты которого не соответствуют требованиям нормативной документации. Анализ проводят на удвоенном количестве образцов препарата.

8. Биохимические тесты для идентификации микроорганизмов

8.1. Тест на наличие фермента цитохромоксидаза (оксидазный тест)

Реактив – 1 % раствор N,N-диметил-*пара*-фенилендиамина дигидрохлорида. Раствор хранят при температуре 2 – 8 ^{o}C во флаконах из нейтрального светозащитного стекла в течение установленного валидированного срока годности. Раствор должен быть бесцветным.

Полоску фильтровальной бумаги смачивают реактивом. Платиновой петлей или стеклянной палочкой наносят 24-часовую чистую культуру исследуемых бактерий, выросших на соево-казеиновом агаре (или среде № 1). Темно-красное окрашивание, появляющееся в течение 1 мин, свидетельствует о положительной оксидазной реакции. Положительным контролем служит тест-микроорганизм *P. aeruginosa*, отрицательным – тест-микроорганизм *E. coli* (окраска отсутствует).

8.2. Тест на наличие индола

Реактив Ковача:

- Спирта амилового или изоамилового - 75 мл
- *пара*-Диметиламинобензальдегида - 5 г
- Хлористоводородной кислоты, концентрированной - 20 мл

Соответствующее количество *пара*-диметиламинобензальдегида растворяют в изоамиловом или амиловом спирте при нагревании на водяной бане при температуре (52,5 ± 2,5) °С, остужают и по каплям прибавляют хлористоводородную кислоту. Раствор хранят в защищенном от света месте при температуре 2 – 8 °С. Реактив должен быть желтого цвета. При неправильном хранении цвет реактива становится коричневым, и реактив становится непригодным для использования.

В пробирку с соево-казеиновым бульоном, в которой выросла исследуемая суточная культура, вносят 0,5 мл реактива Ковача и слегка встряхивают. Через 3 – 5 мин при наличии индола наблюдают появление красного кольца на поверхности среды в пробирке. Положительным контролем является тест-микроорганизм *E. coli*, отрицательным – тест-штамм *S. enterica ssp.enterica ser.abony* (окраска отсутствует).

8.3. Тест на наличие фермента коагулазы (реакция плазмокоагуляции)

Сухую цитратную кроличью плазму разводят согласно приложенной инструкции 0,9 % стерильным раствором натрия хлорида и разливают по 0,5 мл в стерильные пробирки. Вносят в пробирку с восстановленной кроличьей плазмой 1 петлю суточной чистой культуры выделенных бактерий, выращенных на соево-казеиновом агаре (или на среде № 1). Вторую пробирку не инокулируют (отрицательный контроль). Положительным контролем служит тест-штамм *S. aureus*, отрицательным – тест-штамм *S. epidermidis*. Все пробирки инкубируют в стандартных условиях. Реакцию плазмокоагуляции отмечают через каждый час в течение 4 – 6 ч, слегка наклоняя пробирку, не встряхивая ее.

При отсутствии положительной реакции плазмокоагуляции удлиняют время инкубации до 24 ч для получения окончательных результатов. Тест на наличие коагулазы считается положительным при обнаружении сгустка плазмы.

Помимо тестов, описанных выше, для идентификации могут быть использованы другие методы (тест-системы, автоматические анализаторы и др.).

9. Питательные среды и растворы

Для испытания качества ЛС на микробиологическую чистоту используют питательные среды отечественного или зарубежного производства.

При приготовлении питательных сред в лаборатории необходимо строго придерживаться приведенной рецептуры, а при использовании коммерческих сухих питательных сред – инструкции предприятия-изготовителя. Входящие в состав питательных сред индикаторы и красители добавляют в виде растворов определенной концентрации. Необходимое значение pH питательной среды устанавливают при температуре (22,5 ± 2,5) ^{o}C.

Если нет других указаний в нормативной документации, среды стерилизуют в автоклаве при температуре 121 ^{o}C в течение 15 мин, при условии валидации процесса стерилизации.

Фосфатный буферный раствор с натрия хлоридом и пептоном (pH 7,0):

- Калия фосфат однозамещенный 3,6 г
- Натрия фосфат двузамещенный 7,2 г
- Натрия хлорид 4,3 г
- Пептон (мясной или казеиновый) 1,0 г
- Вода очищенная 1000,0 мл

Натрия хлорида раствор 0,9 %

- Натрия хлорид 9 г
- Вода очищенная 1000,0 мл

pH после стерилизации 7,2 ±0,2

Нейтрализующая жидкость

- Твин-80 30,0 г
- Лецитин (яичный или соевый) 3,0 г
- Гистидина гидрохлорид 1,0 г

- Пептон (мясной или казеиновый) 1,0 г
- Натрия хлорид 4,3 г
- Калия фосфат однозамещенный 3,6 г
- Натрия фосфат двузамещенный 7,2 г
- Вода очищенная 1000,0 мл

  pH после стерилизации 7,6 ± 0,2

Полужидкий агар для хранения тест-микроорганизмов

- Панкреатический гидролизат казеина 8,0 г
- Натрия хлорид 5,0 г
- Агар микробиологический 5,0 г
- Вода очищенная 1000,0 мл

  pH после стерилизации 7,0 ± 0,2

Соево-казеиновый агар (Casein Soya Bean Digest agar)

- Панкреатический гидролизат казеина 15,0 г
- Папаиновый гидролизат бобов сои 5,0 г
- Натрия хлорид 5,0 г
- Агар микробиологический 15,0 г
- Вода очищенная 1000,0 мл

  pH после стерилизации 7,3 ± 0,2

Альтернативная среда отечественного производства для выращивания аэробных бактерий – среда № 1 для контроля микробной загрязненности, сухая; мясопептонный агар (МПА); агаризованные питательные среды на основе гидролизата рыбной муки (ГРМ).

Бульон Сабуро (Sabouraud Broth)

- Пептон (мясной) 5,0 г
- Пептон (казеиновый) 5,0 г
- Глюкозы моногидрат 20,0 г
- Вода очищенная 1000,0 мл

  pH после стерилизации 5,6 ± 0,2

Агар Сабуро с глюкозой (Sabouraud 4% Glucose Agar)

- Пептон (мясной или казеиновый) 10,0 г
- Глюкозы моногидрат 40,0 г
- Агар бактериологический 15,0 г
- Вода очищенная 1000,0 мл

  pH после стерилизации 5,6 ± 0,2

Альтернативная отечественная среда для выращивания дрожжевых и плесневых грибов – среда № 2 (агар Сабуро с глюкозой) для контроля микробной загрязненности, сухая, различных производителей.

Для повышения селективности среды с целью предотвращения роста бактерий перед стерилизацией добавляют 50 мг хлорамфеникола (левомицетина) на 1 л среды или перед розливом в чашки Петри в расплавленную среду вносят 0,1 г натриевой соли бензилпенициллина и 0,1 г тетрациклина на 1 л среды в виде стерильных растворов.

Бульон Мосселя для обогащения энтеробактерий (Enterobacteria Enrichment Broth – Mossel)

• Панкреатический гидролизат желатина	10,0 г
• Глюкозы моногидрат	5,0 г
• Бычья желчь сухая	20,0 г
• Калия фосфат однозамещенный	2,0 г
• Натрия фосфат двузамещенный	8,0 г
• Бриллиантовый зеленый	0,015 г
• Вода очищенная	1000,0 мл
pH	7,2 ± 0,2

Среду нагревают при температуре 100 °С в течение 30 мин с последующим быстрым охлаждением.

Альтернативная отечественная среда для обогащения энтеробактерий– среда № 3 для контроля микробной загрязненности, сухая; различных производителей.

Агар Мосселя (Crystal violet, Neutral Red, Bile Agar with Glucose)

• Дрожжевой экстракт	3,0 г
• Панкреатический гидролизат казеина	7,0 г
• Соли желчи	1,5 г
• Лактозы моногидрат	10,0 г
• Натрия хлорида	5,0 г
• Глюкозы моногидрат	10,0 г
• Агар микробиологический	15,0 г
• Нейтральный красный	0,03 г
• Кристаллический фиолетовый	0,002 г
• Вода очищенная	1000,0 мл
pH	7,4 ± 0,2

Нагревают до кипения. Среду не автоклавируют.

Альтернативная отечественная среда для выделения энтеробактерий – среда № 4 (Эндо) для контроля микробной загрязненности, сухая; различных производителей.

Бульон Мак-Конки (MacConkey Broth)

- Панкреатический гидролизат желатина 20,0 г
- Лактозы моногидрат 10,0 г
- Бычья желчь сухая 5,0 г
- Бромкрезоловый пурпурный 0,01 г
- Вода очищенная 1000,0 мл

pH после стерилизации 7,3 ±0,2

Альтернативная отечественная среда обогащения для энтеробактерий – среда № 3 для контроля микробной загрязненности, сухая, различных производителей.

Агар Мак-Конки (MacConkey Agar)

- Панкреатический гидролизат желатина 17,0 г
- Пептон (мясный или казеиновый) 3,0 г
- Лактозы моногидрат 10,0 г
- Натрия хлорид 5,0 г
- Соли желчи 1,5 г
- Агар микробиологический 13,5 г
- Нейтральный красный 0,03 г
- Кристаллический фиолетовый 0,001 г
- Вода очищенная 1000,0 мл

pH после стерилизации 7,1 ± 0,2

Перед стерилизацией кипятят 1 мин, постоянно встряхивая.

Альтернативная отечественная среда для выделения энтеробактерий – среда № 4 (Эндо) для контроля микробной загрязненности, сухая, различных производителей.

Накопительная среда для бактерий рода Salmonella (бульон Раппопорта – Вассилиадиса)

- Соевый пептон 4,5 г
- Магния хлорид шестиводный 29,0 г
- Натрия хлорид 7,2 г
- Калий фосфорнокислый двузамещенный 0,18 г
- Калий фосфорнокислый однозамещенный 1,26 г
- Малахитовый зеленый 0,036 г
- Вода очищенная 1000,0 мл

pH после стерилизации 5,2 ± 0,2

Среду автоклавируют в течение 15 мин при температуре 115 °С.

Ксилоза, лизин, дезоксихолат агар (Xylose, Lisine, Deoxycholate Agar)

- Ксилоза 3,5 г
- L–лизин 5,0 г
- Лактозы моногидрат 7,5 г
- Сахароза 7,5 г
- Натрия хлорид 5,0 г
- Дрожжевой экстракт 3,0 г
- Феноловый красный 0,08 г
- Агар микробиологический 13,5 г
- Натрия дезоксихолат 2,5 г
- Натрия тиосульфат 6,8 г
- Железа аммоний цитрат 0,8 г
- Вода очищенная 1000,0 мл

  pH 7,4 ± 0,2

Доводят до кипения, охлаждают до температуры 50 °С и разливают в чашки Петри. Среду не автоклавируют.

Висмут-сульфитный агар (Bismuth Sulfite agar)

- Мясной экстракт 5,0 г
- Мясной пептон 10,0 г
- Глюкозы моногидрат 5,0 г
- Натрия фосфат двузамещенный 4,0 г
- Железа сульфат 0,3 г
- Бриллиантовый зеленый 0,025 г
- Висмута сульфит 8,0 г
- Агар микробиологический 15,0 г
- Вода очищенная 1000,0 мл

  pH 7,6 ± 0,2

Среду не автоклавируют. Приготовленная среда непрозрачна, зеленого цвета.

Альтернативная отечественная среда для выделения сальмонелл – среда № 5 для контроля микробной загрязненности, сухая, различных производителей.

Соево-казеиновый бульон (Casein Soya Bean Digest Broth)

- Панкреатический гидролизат казеина 17,0 г
- Папаиновый гидролизат бобов сои 3,0 г
- Натрия хлорид 5,0 г
- Калия фосфат двузамещенный 2,5 г

- Глюкозы моногидрат 2,5 г
- Вода очищенная 1000,0 мл

  pH после стерилизации 7,3 ± 0,2

Альтернативная отечественная среда для выращивания бактерий – среда № 8 для контроля микробной загрязненности, сухая, различных производителей.

Цетримидный агар (Cetrimide Agar)

- Панкреатический гидролизат желатина 20,0 г
- Магния хлорид 1,4 г
- Калия сульфат двузамещенный 10,0 г
- Цетримид (цетилпиридиния бромид) 0,3 г
- Агар микробиологический 13,6 г
- Глицерин 10,0 мл
- Вода очищенная 1000,0 мл

  pH после стерилизации 7,2 ± 0,2

Альтернативная отечественная среда для выделения синегнойной палочки – ЦПХ (среда № 16) – агар для выделения синегнойной палочки, сухая.

ЦПХ агар (среда № 16)

- Пептон сухой ферментативный 20,0 г
- Калий сернокислый 7,6 г
- Магний сернокислый семиводный 2,4 г
- Сода кальцинированная 1,0 г
- Фенозан-кислота 0,2 г
- ЦПХ (N-цетилпиридиний хлористый 1-водный) 0,3 г
- Агар микробиологический 8,0 г
- Вода очищенная 1000,0 мл

  pH 7,2 ± 0,2

  Среду не автоклавируют.

Агар для выявления пиоцианина бактерий рода Pseudomonas (Pseudomonas Agar Medium for Detection of Pyocyanin)

- Панкреатический гидролизат желатина 20,0 г
- Магния хлорид безводный 1,4 г
- Калия сульфат безводный 10,0 г
- Агар микробиологический 15,0 г
- Глицерин 10,0 мл
- Вода очищенная 1000,0 мл

pH после стерилизации	7,2 ± 0,2

Все компоненты, кроме глицерина, растворяют в воде. Нагревают при перемешивании и кипятят 1 мин. Добавляют глицерин и стерилизуют.

Альтернативная отечественная среда для идентификации синегнойной палочки – среда № 9 для контроля микробной загрязненности, сухая, различных производителей.

Маннитно-солевой агар

• Пептон ферментативный сухой	10,0 г
• D-Маннит	10,0 г
• Натрия хлорид	75,0 г
• Агар микробиологический	15,0 г
• Феноловый красный	0,025 г
• Вода очищенная	1000,0 мл
pH после стерилизации	7,4 ± 0,2

Альтернативная отечественная среда для выделения и идентификации золотистого стафилококка – среда № 10 для контроля микробной загрязненности, сухая, различных производителей.

Трехсахарный агар с солями железа (Triple Sugar–Iron–Agar)

• Мясной экстракт	3,0 г
• Дрожжевой экстракт	3,0 г
• Пептон (казеиновый или мясной)	20,0 г
• Натрия хлорид	5,0 г
• Лактозы моногидрат	10,0 г
• Сахароза	10,0 г
• Глюкозы моногидрат	1,0 г
• Железо–аммоний цитрат	0,3 г
• Натрия тиосульфат	0,3 г
• Феноловый красный	0,025 г
• Агар микробиологический	12,0 г
• Вода очищенная	1000,0 мл
pH после стерилизации	7,4 ± 0,2

Среду разливают в пробирки, заполняя их на 1/3 объема. После стерилизации среду оставляют для застывания таким образом, чтобы образовались столбик и скошенная часть над ним.

Альтернативная отечественная среда для идентификации сальмонелл – среда № 13 для контроля микробной загрязненности, сухая, различных производителей.

Цитратный агар Симмонса

• Натрия хлорид	5,0 г
• Магния сульфат	0,2 г
• Аммония дигидрофосфат	1,0 г
• Калия гидрофосфат	1,0 г
• Натрия цитрат	3,0 г
• Бромтимоловый синий	0,08 г
• Агар микробиологический	20,0 г
• Вода очищенная	1000,0 мл
pH после стерилизации	7,2 ± 0,2

Альтернативная отечественная среда для идентификации *E. coli* – среда № 14 для контроля микробной загрязненности, сухая, различных производителей.

Питательный агар с глюкозой

• Триптический гидролизат казеина с содержанием аминного азота 150 мг %	150 мл
• Экстракт кормовых дрожжей	5,0 г
• Агар микробиологический	20,0 г
• Глюкоза	5,0 г
• Натрия хлорид	5,0 г
• Вода очищенная	до 1000,0 мл
pH после стерилизации	7,2 ± 0,2

Стерилизация: при температуре 121 °С, 15 мин

Мясопептонный агар (МПА) с 0,5 % глюкозы

• Мясная вода	1000,0 мл
• Натрия хлорид	5,0 г
• Пептон ферментативный сухой	10,0 г
• Агар микробиологический	20,0 г
• Глюкоза	5,0 г
pH после стерилизации	7,4 ± 0,1

Стерилизация: при температуре 121 °С, 15 мин.

Питательный агар с 9 % натрия хлорида (солевой агар)

- Мясная вода (или мясо-трипсиновый гидролизат (Гидролизат Хоттенгера) с содержанием аминного азота (0,6±0,05) %, разведенного водой до содержания аминного азота до (0,14± 0,01) % — 1000,0 мл
- Натрия хлорид — 90,0 г
- Пептон ферментативный сухой — 10,0 г
- Агар микробиологический — 15,0 г
- Глюкоза — 5,0 г

pH после стерилизации — 7,4 ± 0,1

Стерилизация: при температуре 121 °С, 15 мин

Питательный агар с 9 % натрия хлорида может быть приготовлен на основе МПА с добавлением 9 % натрия хлорида.

Мясотрипсиновый гидролизат с содержанием аминного азота (0,60 + 0,05) %

- Мясо (говядина) — 1000,0 г
- Вода питьевая — 2000,0 мл
- Железа поджелудочная крупного рогатого скота — 130,0- 200 г
  или Панкреатин — 40 г
- Хлороформ — 40 г
- Натрия гидрокарбонат — 13,0 г

pH после стерилизации — 7,4 ± 0,1

Стерилизация: при температуре 121 °С, 45 мин.

Кровяной агар

- 2 % мясопептонный агар — 950,0 мл
- Дефибринированная кровь — 50,0 мл

pH после стерилизации — 7,4 ± 0,1

В расплавленный и охлажденный до температуры 45 °С МПА добавляют дефибринированную кровь (человека, барана, кролика), перемешивают до однородного состояния и разливают по чашкам Петри.

Приготовление дефибринированной крови. Кровь асептически собирают в стерильный сосуд, на дне которого находятся стеклянные бусы, закрывают пробкой и встряхивают 20 – 25 мин до выпадения фибрина; жидкую, не свернувшуюся часть крови, добавляют в нужном количестве к охлажденному до температуры (45 ± 2) ^{o}С МПА.

Среда с мочевиной

• Гидролизат казеина, сброженный *E. coli* М-17 (содержание аминного азота (6,6 ± 0,6 г/л[а])	80,0 мл
• Натрия хлорид	5,0 г
• Агар микробиологический	10,0 г
• Мочевина	10,0 г
• Лактоза	10,0 г
• Глюкоза	1,0 г
• Индикатор комбинированный (Андреде с добавлением 0,35 % бромтимолового синего)[б]	40,0 мл
• Вода очищенная	до 1000,0 мл
pH после стерилизации	7,1 ± 0,1

Стерилизация: при температуре 110 °С, 15 мин.

[а] Приготовление сброженного казеинового гидролизата. Микробную суспензию готовят суспендированием в 0,9 % растворе натрия хлорида 24-часовой культуры *E. coli* М-17, выращенной на МПА. Полученную микробную суспензию доводят до 10 МЕ мутности по ОСО мутности. На 1 л казеинового гидролизата добавляют 3 – 5 мл микробной суспензии, инкубируют в течение 24 ч при температуре (37 ± 1) °С и стерилизуют.

[б] Приготовление комбинированного индикатора Андреде. К 400 мл воды дистиллированной прибавляют 1 г фуксина кислого и 64 мл 1 М раствора натрия гидроксида, выдерживают 1 сут при температуре (37 ± 1) °С и 2 сут при комнатной температуре. Хранят в бутыли темного стекла с притертой пробкой при комнатной температуре в защищенном от света месте.

При приготовлении комбинированного индикатора Андреде к 100 мл индикатора Андреде добавляют 350 мг бромтимолового синего.

Среда с мочевиной по Преусу

• Мясотрипсиновый гидролизат с содержанием аминного азота (0,60 ± 0,05) % [а]	1000,0 мл
• Агар микробиологический	15,0 г
• Глюкоза	5,0 г
• Мочевина (раствор 50 %-ный водный)	20,0 мл
• Бромтимоловый синий	12,0 мл
pH после стерилизации	7,0 ± 0,1

Среда Гаузе № 2 агаризованная

- Бульон Хоттингера с содержанием амминного азота 700 мг% (или мясо-трипсиновый гидролизат (Гидролизат Хоттенгера) с содержанием аминного азота (0,6±0,05) % - 40 мл) — 30,0 мл
- Пептон сухой — 5,0 г
- Натрия хлорид — 5,0 г
- Глюкоза или Декстрозы могогидрат — 10,0 г
- Агар микробиологический — 30,0 г
- Вода очищенная — до 1000,0 мл

  pH после стерилизации — 7,2 ± 0,2

Стерилизация: при температуре 121 °С 15мин.

Бульон Хоттингера

- Гидролизат Хоттингера — 24,0 г
- Натрия хлорид — 5,0 г
- Вода очищенная — до 1000,0 мл

  pH после стерилизации — 7,2 ± 0,2

Желточно-солевой агар

- Мясопептонный агар — 850,0 мл
- Натрия хлорид — 90,0 г
- Желточная взвесь (1 желток на 200 мл 0,9 % раствора натрия хлорида) — 150,0 мл
- Вода очищенная — до 1000,0 мл

  pH после стерилизации — 7,2 ± 0,2

Возможно внесение изменений в составы питательных сред и замена материалов животного происхождения компонентами промышленного производства при условии подтверждения качества и валидации их применения для проведения испытаний по показателю «Микробиологическая чистота».

10. Оценка качества питательных сред

Для каждой серии коммерческой среды (сухой и готовой к использованию), а также для каждой партии среды, изготовленной в лаборатории, проводят определение ростовых, селективных и диагностических свойств.

Основными биологическими критериями качества питательных сред являются их ростовые и селективные свойства, определяемые с помощью микроорганизмов и аттестованных питательных сред. В качестве аттестованных используют готовые к применению среды с сертификатом производителя, а также ранее аттестованные в лаборатории среды высокого качества.

Ростовые свойства питательной среды – это способность питательной среды обеспечивать эффективный и типичный рост соответствующих тест-штаммов микроорганизмов.

Селективные свойства – это способность питательной среды подавлять рост сопутствующих микроорганизмов из микробной ассоциации.

Тест-микроорганизмы, штаммы-ассоцианты и условия инкубации для определения ростовых и селективных свойств питательных сред представлены в табл. 8. Номера тест-штаммов приведены в табл. 3.

10.1. Ростовые свойства питательных сред

10.1.1. Приготовление рабочей взвеси тест-микроорганизмов

Культуры бактерий и грибов *C. albicans* смывают с поверхности скошенного агара стерильным 0,9 % раствором натрия хлорида. Готовят стандартные взвеси каждого тест-штамма, соответствующие 10 ME по стандартному образцу мутности. Для культур *B. subtilis, B. cereus* и *C. albicans* – это концентрация 10^7 КОЕ/мл, для *E. coli, S. abony, P. aeruginosa, S. aureus* – 10^9 КОЕ/мл. Стандартизованные взвеси методом последующих десятикратных разведений доводят стерильным 0,9 % раствором натрия хлорида до концентрации 10^3 КОЕ/мл. Для определения фактической концентрации рабочих взвесей бактерий и *C. albicans* культуры высевают поверхностным методом из концентрации 10^3 КОЕ/мл по 0,1 мл на чашку Петри с соответствующей аттестованной агаризованной средой.

Для смыва конидий *A. brasiliensis* с агара Сабуро с глюкозой используют стерильный 0,9 % раствор натрия хлорида, содержащий 0,05 %

твина-80. Количество конидий в 1 мл взвеси определяют с помощью камеры Горяева или посевом подходящего разведения на аттестованный агар Сабуро с глюкозой или среду № 2.

Для посева готовят рабочую взвесь *A. brasiliensis* с концентрацией конидий около $0,5 \cdot 10^3$ в 1 мл, которую высевают поверхностным методом по 0,1 мл на чашки с агаром Сабуро с глюкозой (или средой № 2).

Приготовленные рабочие взвеси тест-микроорганизмов используют для определения ростовых свойств питательных сред. Количество клеток тест-штаммов для внесения в жидкую или агаризованную питательные среды не должно превышать 10^2 КОЕ.

10.1.2. Испытание агаризованных сред

Испытуемую и аттестованную агаризованные среды разливают в чашки Петри диаметром 90 мм по 15 – 20 мл, подсушивая агар после застывания. По 0,1 мл рабочей взвеси тест-микроорганизма с концентрацией 10^3 КОЕ/мл засевают поверхностным методом на чашки Петри с испытуемой и аттестованной средами в двойной повторности.

На агаризованнных средах после инкубации подсчитывают колонии тест-штаммов микроорганизмов и определяют коэффициент прорастания $К_{пр}$ по формуле:

$$К_{пр} = \frac{N}{N_o},$$

где: N – среднее арифметическое числа колоний на чашке Петри с испытуемой средой;

N_o – среднее арифметическое числа колоний на чашке Петри с аттестованной средой.

10.1.3. Испытание жидких сред

Жидкие испытуемые и аттестованные питательные среды разливают в стерильные пробирки по 10 мл. По 0,1 мл рабочей взвеси тест-штамма микроорганизма с концентрацией 10^3 КОЕ/мл засевают в пробирки с испытуемой и стандартной средой (по 3 пробирки для каждого вида среды).

Инкубируют при соответствующей температуре в течение минимального для этого теста времени. Рост микроорганизмов определяют визуально.

10.1.4. Требование к ростовым свойствам питательных сред

Испытуемая агаризованная среда считается годной к использованию, если коэффициент прорастания не менее 0,7 по сравнению с аттестованной питательной средой.

Испытуемая жидкая среда считается годной к использованию, если на испытуемой и аттестованных средах наблюдают визуально одинаковый рост тест-штамма.

10.2. Определение селективных свойств питательных сред

10.2.1. Проведение испытания

Для определения селективных свойств питательных сред испытуемую и аттестованную среды контаминируют штаммами-ассоциантами, каждым в отдельности, с посевной дозой на 2 порядка выше, чем доза тест-штамма.

Для посева на жидкие питательные среды в 3 пробирки с каждой средой вносят по 0,1 мл рабочей взвеси с концентрацией 10^5 КОЕ/мл штамма-ассоцианта. На всех засеянных питательных средах (в чашках Петри и пробирках) после наиболее длительного срока инкубации для этого теста при соответствующей температуре отмечают отсутствие роста штамма-ассоцианта.

10.2.2.Требование к селективным свойствам питательных сред

Испытуемая селективная среда считается годной к использованию, если при посеве штаммов-ассоциантов наблюдается полное отсутствие их роста.

10.3. Определение диагностических свойств питательных сред

10.3.1. Выполнение испытания

Испытание диагностических свойств проводят для таких питательных сред, как агар Мосселя (или среда № 4), агар Мак-Конки, ксилозо-лизин-дезоксихолат-агар (или среда № 5), цетримидный агар (или ЦПХ-агар), агар для выявления пиоцианина (или среда № 9), маннитно-солевой агар (или

среда № 10), трехсахарный агар с солями железа (или среда № 13), цитратный агар Симмонса (или среда № 14).

Для подтверждения диагностических свойств питательной среды бактериологической петлей делают посев бульонной культуры тест-микроорганизмов (каждого в отдельности) на 2 чашки Петри или в 2 пробирки с испытуемой средой. После инкубации в стандартных условиях определяют характерные признаки тест-штаммов определенного вида микроорганизмов: внешний вид колоний, цвет, наличие пигмента, ореол вокруг колоний, изменение цвета среды и др. (табл. 7).

Для подтверждения селективных свойств диагностических питательных сред делают посев бульонной культуры штаммов-ассоциантов (каждого в отдельности) на испытуемую среду. После инкубации в стандартных условиях рост штаммов-ассоциантов должен отсутствовать.

10.3.2. Требование к диагностическим свойствам питательных сред

Испытуемая среда считается годной к использованию, если морфологические признаки тест-микроорганизмов соответствуют описанию, приведенному в табл. 7, а рост штаммов-ассоциантов полностью отсутствует.

10.4. Стерильность питательных сред

Не менее 5 % емкостей (флаконов, пробирок и др.) от каждой партии приготовленной питательной среды контролируют на стерильность, выдерживая их при соответствующей температуре в течение 48 – 72 ч. При обнаружении микробного роста хотя бы в одной из емкостей испытуемая партия питательной среды подлежит уничтожению.

10.5. Хранение питательных сред

Сухие питательные среды необходимо хранить герметично упакованными, в защищенном от света сухом месте при температуре 2 – 30^{o}C в соответствии с инструкцией производителя. После вскрытия упаковки на флаконе необходимо написать дату и далее хранить при комнатной температуре до окончания срока годности. Приготовленные из сухих смесей и разлитые во флаконы питательные среды хранят 1 мес при комнатной

температуре или 3 мес при температуре 2 – 8 °С, если не указано иное в нормативной документации производителя. Срок годности сред, разлитых в чашки Петри, составляет 7 сут при температуре 2 – 8 °С. Исключение составляет среда № 4, разлитая в чашки Петри, срок годности которой не более 3 сут при хранении без доступа света. Промышленные готовые питательные среды во флаконах и чашках хранят в соответствии с инструкцией производителя.

Таблица 8 – Тест-микроорганизмы и условия инкубации для определения ростовых и селективных свойств питательных сред

Питательные среды	Применение	Микроорганизмы	Условия инкубации
1	2	3	4
• Соево-казеиновый агар • Среда № 1 для выращивания бактерий • МПА • ГРМ агар • МПА с 0,5 % глюкозы	Выделение аэробных микроорганизмов	*Bacillus subtilis* или *Bacillus cereus*; *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus*	72 ч (32,5 ± 2,5) °С
• Бульон Сабуро	Выделение дрожжевых грибов	*Candida albicahs*	5 сут (22,5 ± 2,5) °С
• Агар Сабуро с глюкозой • Среда № 2 для выращивания грибов	Выделение дрожжевых и плесневых грибов	*Candida albicahs*; *Aspergillus brasiliensis* или *A. niger*	5 сут (22,5 ± 2,5) °С
• Бульон Мосселя • Бульон Мак-Конки • Среда № 3	Обогащение энтеробактерий	*Escherichia coli*; *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *abony* Штаммы-ассоцианты: *Staphylococcus aureus*	24– 48 ч (32,5 ± 2,5) °С
• Агар Мак-Конки • Агар Мосселя • Среда №4 для выделения энтеробактерий (Эндо)	Выделение энтеробактерий	*Escherichia coli*; *Salmonella enterica* subsp.*enterica* serovar *abony* Штаммы-ассоцианты: *Staphylococcus aureus*	24 – 48 ч (32,5 ± 2,5) °С
• Ксилоза-лизин-дезоксихолат агар • Висмут-сульфитный агар • Среда № 5 для идентификации бактерий рода *Salmonella*	Выделение бактерий рода *Salmonella*	*Salmonella enterica ssp. enterica serovar abony* Штаммы-ассоцианты: *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus* или *Bacillus cereus*	24 – 48 ч (32,5 ± 2,5) °С
• Соево-казеиновый бульон • Среда № 8 для выращивания бактерий	Накопление аэробных бактерий	*Bacillus cereus* или *Bacillus subtilis*; *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus*; *Pseudomonas aeruginosa*	24 ч (32,5 ± 2,5) °С
• Агар для выявления пиоцианина *P. aeruginosa*	Выделение *P. aeruginosa*	*Pseudomonas aeruginosa*	24 – 48 ч (32,5 ± 2,5) °С

• Среда № 9 для идентификации *P. aeruginosa*			
• Цетримидный агар • ЦПХ-агар для выделения *P. aeruginosa*	Идентификация *P. aeruginosa*	*Pseudomonas aeruginosa* Штаммы-ассоцианты: *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus*	24 – 48 ч (32,5 ± 2,5) °С
• Маннитно-солевой агар • Среда № 10 для идентификации *S. aureus* • Питательный агар с 9 % натрия хлорида	Идентификация *S. aureus*	*Staphylococcus aureus*; *Staphylococcus epidermidis* Штамм-ассоциант: *Pseudomonas aeruginosa*	48 ч (32,5 ± 2,5) °С
• Бульон Раппопорта – Вассилиадиса	Обогащение бактерий рода *Salmonella*	*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *abony*	24 ч (32,5 ± 2,5) °С
• Трехсахарный агар с солями железа • Среда № 13 для идентификации бактерий рода *Salmonella*	Идентификация бактерий рода *Salmonella*	*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *abony;* *Escherichia coli*	24 ч (32,5 ± 2,5) °С
• Цитратный агар Симмонса • Среда № 14 для идентификации *E. coli*	Идентификация *E. coli*	*Escherichia coli*; *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *abony*	24 ч (32,5 ± 2,5) °С

11. Особенности проведения испытаний биологических лекарственных препаратов (БЛП), содержащих живые микроорганизмы

Пробиотики медицинского применения

11.1. Отбор проб

Испытания проводятся в асептических условиях.

От каждой серии ЛС отбирают не менее чем по 10 единиц (флаконов, капсул, таблеток, суппозиториев)/г препарата не менее чем из 5 различных упаковок, при увеличении серии – дополнительно по 1 флакону (капсуле, таблетки, суппозиторию т.д.) от каждой тысячи.

Две единицы испытуемого препарата (флаконы, капсулы, таблетки, суппозитории и т.д.) объединяют в 1 образец (получая пять объединенных образцов), если нет других указаний в нормативной документации.

Суспензии – содержимое 2 флаконов объединяют в 1 образец, перемешивают пипеткой 8 – 10 раз и получают исходное разведение.

Лиофилизаты для приготовления растворов или суспензий для приема внутрь и местного применения – содержимое каждого флакона разводят стерильным 0,9 % раствором натрия хлорида из расчета 1 мл на 1 дозу. Объединяют полученную суспензию из 2 флаконов, перемешивают 8 – 10 раз и получают исходное разведение.

Таблетки – каждый образец (2 таблетки) предварительно асептически растирают в ступке до гомогенного состояния (или в пробирке до состояния порошка) и дробно добавляют 20 мл стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида, перемешивают и получают исходное разведение.

Порошки – каждый образец (содержимое 2 саше) помещают в колбу, добавляют 20 мл стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида, перемешивают и получают исходное разведение.

Капсулы – каждый образец (2 капсулы) вносят в пробирки, добавляют 20 мл предварительно нагретого до температуры (39 ± 1) ^{o}C стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида.

Суппозитории – каждый образец (2 суппозитория) помещают в пробирки, добавляют предварительно нагретый до температуры (39 ± 1) °С стерильный 0,9 % раствор натрия хлорида до общего объема 20 мл.

Пробирки с капсулами или суппозиториями помещают на водяную баню при температуре (39 ± 1) °С. Через 10 – 30 мин содержимое пробирок перемешивают до гомогенного состояния, получая исходное разведение.

Условия проведения испытания на микробиологическую чистоту препаратов пробиотиков представлены в табл. 9-10.

11. 2. Методы проведения анализа

11.2.1. Метод прямого посева

Из полученной суспензии испытуемого образца соответствующего разведения по 1 мл высевают на чашки Петри или в широкие (d = 20 мм, h = 200 мм) пробирки (флаконы) со скошенными столбиками питательной среды.

На чашках Петри суспензию распределяют, осторожно покачивая, по всей поверхности питательной среды без применения шпателя. Чашки выдерживают 30 – 40 мин на плоскости стола, не переворачивая, до полного впитывания суспензии в агар, после чего переворачивают вверх дном и инкубируют в термостате.

На средах, скошенных в пробирках (флаконах), посев распределяют путем обкатки и инкубируют в термостате сначала в горизонтальном положении – 2 сут, а в оставшийся период – в вертикальном.

Посев суспензии в пробирки со скошенным агаром с мочевиной делают пастеровской пипеткой уколом до дна пробирки, а остатки посевного материала при выведении пипетки растирают по поверхности скошенной части столбика среды и инкубируют в термостате.

Посев образцов препаратов, в которых не допускается присутствие посторонних микроорганизмов и грибов или допускается не более 50 КОЕ/единицу препарата, производят из исходного разведения испытуемого образца. Посев образцов препаратов, в которых допускается

общее количество аэробных микроорганизмов 10^2 КОЕ/единицу препарата, осуществляют из разведения 1:10 (10^{-1}) испытуемого образца.

Препараты, в состав которых входят живые колибактерии: на чашки Петри с агаром Эндо высевают по 0,5 мл суспензии исходного разведения испытуемого образца. Материал распределяют по поверхности среды шпателем Дригальского, затем тем же шпателем производят посев на новую чашку Петри с агаром Эндо для получения изолированных колоний; проводят не менее 3-4 последовательных пересевов.

При испытании препаратов, в которых не допускается контаминация, перед посевом на среды из каждого образца делают мазки, которые затем, в зависимости от присутствующих в них пробиотических бактерий, окрашивают по Граму или по Цилю-Нильсену, и микроскопируют. Мазок исследуют в 10 полях зрения. В микропрепарате должны присутствовать только характерные для исследуемого образца пробиотика бактерии.

11.2.2. Метод определения степени контаминации аэробными микроорганизмами

Для определения степени контаминации аэробными бактериями готовят дополнительное разведение, для чего 1 мл микробной суспензии из исходного разведения или из разведения 1 : 10 (в зависимости от лекарственной формы и предельно допустимых значений норм микробной контаминации) переносят в пробирки с 9 мл 0,9 % раствора натрия хлорида и перемешивают 8 – 10 раз, получая следующее разведение, т.е. 10^{-1} или 10^{-2} соответственно. Затем производят посев на чашки Петри по 1 мл из разведения 10^{-1} и 10^{-2} (или из исходного разведения и 10^{-1}) на 2 чашки для каждого разведения.

Посев образцов препаратов, в которых допускается общее количество аэробных микроорганизмов 10^2 КОЕ в единице препарата, проводят из разведения 10^{-1} и 10^{-2}. Посев образцов препаратов, в которых допускается общее количество аэробных микроорганизмов не более 50 КОЕ/единицу препарата, проводят из исходного разведения и 10^{-1}.

11.2.3. Метод посева штрихом

Чашку Петри с агаризованной питательной средой делят на 4 – 5 секторов. Посев из исходного разведения испытуемого образца начинают в первом секторе, тщательно втирая взвесь петлей в агар. Затем этой же петлей продолжают посевы во втором и последующих секторах. В последних секторах должны расти изолированные колонии.

11.2.4. Метод определения наличия фага в колисодержащих препаратах

По 1,0 мл исходного разведения испытуемого образца высевают на чашки Петри с МПА. Посевной материал распределяют по всей поверхности среды, покачивая чашку Петри, чтобы получить сплошной газон. Закрытые чашки с посевами выдерживают на столе, не переворачивая, 30 – 40 мин (до полного впитывания суспензии в агар), после чего их переворачивают вверх дном и инкубируют в термостате при температуре (22 ± 1) ^{o}C в течение (19 ± 1) ч.

По окончании инкубации чашки просматривают на наличие зон фаголизиса. Если на фоне роста бактерий *E. coli* на поверхности чашки Петри обнаруживаются зоны фаголизиса любого размера и формы, производят повторный посев на удвоенном количестве образцов.

11.3. Подготовка питательных сред, используемых при определении микробной контаминации препаратов-пробиотиков

Готовые питательные среды расплавляют на водяной бане, охлаждают до температуры (45 ± 1) ^{o}C, разливают по 20-25 мл в чашки Петри диаметром 90 мм, установленные на ровной поверхности. Кровяной агар разливают слоем 1,5 – 2 мм.

После застывания питательной среды закрытые чашки Петри вверх дном помещают в термостат при температуре (37 ± 1) ^{o}C на 48 ч для подсушивания и контроля стерильности питательной среды.

Чашки со средой Эндо подсушивают в ламинарном боксе (под ламинарным потоком воздуха) с открытыми крышками в течение 45 – 50 мин.

Питательные среды в широких пробирках (d = 20 мм, h = 200 мм) или флаконах расплавляют и столбик питательной среды скашивают.

11.4. Учет полученных результатов

Через 72 ч после начала инкубирования посевов и окончательно через 5 – 8 сут подсчитывают число колоний бактерий (допустимой аэробной микрофлоры) на 2 чашках (каждого разведения), находят среднее значение (для колоний, выросших на 2 чашках одного разведения) и, умножая его на показатель разведения, вычисляют число бактерий в 1 таблетке (капсуле, суппозитории и др.) или в 1 г.

Если при посеве образца из разведений 1:10 и 1:100 нет роста, результат отмечают следующим образом: «В 1 капсуле (таблетке, суппозитории и.д.) менее 10 КОЕ бактерий».

При обнаружении в посевах роста условно-патогенных бактерий (энтеробактерий, протеев, гемолизирующих бактерий и др.) и грибов, считают, что качество препарата не соответствует требованиям по показателю «Микробиологическая чистота».

Если количество аэробных микроорганизмов превышает допустимый предел количества КОЕ в 1 таблетке (капсуле, суппозитории и т.д.), то контроль повторяют на удвоенном количестве образцов.

Таблица 9 – Условия проведения испытания на микробиологическую чистоту препаратов пробиотиков, в которых не допускаются микроорганизмы-контаминанты (суспензии и лиофилизаты для приготовления растворов или суспензий для приема внутрь и местного применения)

Группировочное название	Питательные среды	Чашки, пробирки	Условия инкубирования	Учитываемые микроорганизмы	Учет результатов
Бифидосодержащие препараты	МПА или ГРМ-агар	Пробирки (или чашки Петри)	(37 ± 1) °С 8 сут	Аэробные микроорганизмы	Не должно быть роста
	Питательный агар с глюкозой или МПА с 0,5 % глюкозы	Пробирки (или чашки Петри)	(37 ± 1) °С 8 сут	Аэробные микроорганизмы	
	Агар Сабуро	Пробирки (или чашки Петри)	(22 ± 2) °С 8 сут	Дрожжевые и плесневые грибы	
Лактосодержащие препараты (лактобактерии – микроаэрофилы)	МПА	Чашки Петри (или пробирки)	(37 ± 1) °С 8 сут	Аэробные микроорганизмы	Не должно быть роста
	Агар Сабуро	Пробирки (или чашки Петри)	(22 ± 2) °С 8 сут	Дрожжевые и плесневые грибы	
Лактосодержащие препараты (лактобактерии – факультативные анаэробы*)*	Питательный агар с 9 % натрия хлорида	Пробирки (или чашки Петри)	(37 ± 1) °С 8 сут	Аэробные микроорганизмы	Не должно быть роста
	Агар Сабуро с антибиотиками	Пробирки (или чашки Петри)	(22 ± 2) °С 8 сут	Дрожжевые и плесневые грибы	
	Агар Эндо	Чашки Петри	(37 ± 1) °С 24 – 48 ч	Бактерии семейства *Enterobacteriaceae*	
	МПА	Пробирки (или чашки Петри)	(37 ± 1) °С 8 сут	Аэробные микроорганизмы	Не должно быть роста бактерий-контаминантов (допускается рост лактобактерий в виде мелких сероватых полупрозрачных колоний, образующих сплошной

					газон)
Колисодержащие препараты	Питательный агар с 9 % натрия хлорида	Пробирки (или чашки Петри)	(37 ± 1) °С 8 сут	Аэробные микроорганизмов	Не должно быть роста
	Агар Сабуро с антибиотиками	Пробирки (или чашки Петри)	(22 ± 2) °С 8 сут	Дрожжевые и плесневые грибы	
	Агар Эндо	Чашки Петри	(37 ± 1) °С (19 ± 1) ч	Лактозонегативные бактерии семейства *Enterobacteriaceae*	Не должно быть роста лактозонегативных колоний
	МПА (контроль на отсутствие фаголизиса)	Чашки Петри	(20 ± 2) °С (19 ± 1) ч	Для контроля контаминации фагом	Не должно быть зон фаголизиса (для препаратов с содержанием бактерий *E. coli* не менее 10^{10} допускается не более 10 БОЕ бактериофага)
Препараты, содержащие бактерии рода Bacillus (споровые пробиотики)	Агар Сабуро	Чашки Петри	(22 ± 2) °С 8 сут	Дрожжевые и плесневые грибы	Не должно быть роста бактерий-контаминантов (возможен рост бактерий рода *Bacillus* – гладкие белые или с желтовато-розовым оттенком колонии)
	Агар Сабуро с антибиотиками	Чашки Петри	(22 ± 2) °С 8 сут	Дрожжевые и плесневые грибы	Не должно быть роста
	Агар Эндо	Чашки Петри	(37 ± 1) °С 24 - 48 ч	Бактерии семейства *Enterobacteriaceae*	Не должно быть роста бактерий-контаминантов (возможен рост бактерий рода *Bacillus* – мелкие бесцветные или с оттенком от слабо-розового до красноватого колонии)
	Среда Гаузе № 2	Чашки Петри	(37 ± 1) °С 8 сут	Аэробные микроорганизмы	Не должно быть роста бактерий-контаминантов (возможен рост бактерий рода *Bacillus* – шероховатые с фестончатыми краями розовато-бежевые и

					гладкие белые колонии)
	Желточно-солевой агар (или среда № 10) или Солевой агар)	Чашки Петри	(37 ± 1) °С 72 ч	Стафилококки	Не должно быть роста бактерий-контаминантов (возможен рост бактерий рода *Bacillus* – круглые белые, хорошо снимающиеся колонии)

Примечание. При появлении сомнительных колоний производят микроскопическое исследование.

Таблица 10 – Условия проведения испытания на микробиологическую чистоту препаратов пробиотиков, в которых допускается содержание посторонних микроорганизмов и грибов (суппозитории, таблетки, капсулы)

Группировочное название/ лекарственная форма	Питательные среды	Чашки, пробирки	Условия инкубирования	Учитываемые микроорганизмы	Учет результатов
Бифидосодержащие препараты	МПА	Чашки Петри	(37 ± 1) °С 8 сут	Аэробные бактерии	Подсчитывают число бактериальных колоний допустимых бактерий-контаминантов
	Среда Эндо	Чашки Петри	(37 ± 1) °С 24 – 48 ч	Бактерии семейства *Enterobacteriaceae*	Не должно быть роста
	Кровяной агар	Чашки Петри	(37 ± 1) °С 24 – 48 ч	Гемолизирующие микроорганизмы	Не должно быть колоний, окруженных зоной гемолиза и общее количество КОЕ апатогенных аэробных микроорганизмов в одно единице препарата (дозе, капсуле, таблетке и т.д.) не должно превышать 100
	Среда с мочевиной и индикатором Андреде или по Преусу	Пробирки	(37 ± 1) °С 24 – 48 ч	Бактерии рода *Proteus*	Не допускается изменение цвета среды
	Агар Сабуро	Чашки Петри	(22 ± 2) °С 8 сут	Дрожжевые и плесневые грибы	Не должно быть роста
	Среда № 9	Чашки Петри	(37 ± 1) °С 24 – 48 ч	*Pseudomonas aeruginosa*	
	Среда № 10	чашки Петри	(37 ± 1) °С 24 – 48 ч	*Staphylococcus aureus*	

Лактосодержащие препараты (лактобактерии – микроаэрофилы)	МПА или среда № 1	Чашки Петри	(37 ± 1) °С 8 сут	Аэробные микроорганизмы	Подсчитывают число бактериальных колоний допустимых бактерий-контаминантов
	Среда Эндо	Чашки Петри	(37 ± 1) °С 24 – 48 ч	Бактерии семейства *Enterobacteriaceae*	Не должно быть роста
	Кровяной агар	Чашки Петри	(37 ± 1) °С 24 – 48 ч	Гемолизирующие микроорганизмы	Не должно быть колоний, окруженных зоной гемолиза и общее количество КОЕ апатогенных аэробных микроорганизмов в одно единице препарата (дозе, капсуле, таблетке и т.д.) не должно превышать 100
	Среда с мочевиной и индикатором Андреде или по Преусу	Пробирки	(37 ± 1) °С 24 – 48 ч	Бактерии рода *Proteus*	Не допускается изменение цвета среды
	Агар Сабуро с антибиотиками или среда № 2	Чашки Петри	(22 ± 2) °С 8 сут	Дрожжевые и плесневые грибы	Не должно быть роста
	Среда № 9	Чашки Петри	(37 ± 1) °С 24 – 48 ч	*Pseudomonas aeruginosa*	
	Среда № 10	Чашки Петри	(37 ± 1) °С 24 – 48 ч	*Staphylococcus aureus*	
Лактосодержащие препараты (лактобактерии – факультативные	Питательный агар с 9 % натрия хлорида	Чашки Петри	(37 ± 1) °С 8 сут	Аэробные микроорганизмы	Подсчитывают число бактериальных колоний допустимых бактерий-контаминантов

анаэробы)	Среда Эндо	Чашки Петри	(37 ± 1) °С 24 – 48 ч	Бактерии семейства *Enterobacteriaceae*	Не должно быть роста
	Кровяной агар	Чашки Петри	(37 ± 1) °С 24 – 48 ч	Гемолизирующие микроорганизмы	Не должно быть колоний, окруженных зоной гемолиза и общее количество КОЕ апатогенных аэробных микроорганизмов в одно единице препарата (дозе, капсуле, таблетке и т.д.) не должно превышать 100
	Среда с мочевиной и индикатором Андреде или по Преусу	Пробирки	(37 ± 1) °С 24 – 48 ч	Бактерии рода P*roteus*	Не допускается изменение цвета среды
	Агар Сабуро с антибиотиками	Чашки Петри	(37 ± 1) °С 8 сут	Дрожжевые и плесневые грибы	Не должно быть роста
Препараты, содержащие бактерии рода Bacillus (споровые пробиотики)	Агар Сабуро с антибиотиками	Чашки Петри	(22 ± 2) °С 8 сут	Дрожжевые и плесневые грибы	Не должно быть роста
	Агар Эндо	Чашки Петри	(37 ± 1) °С 24-48 ч	Бактерии семейства *Enterobacteriaceae*	Не должно быть роста бактерий-контаминантов (возможен рост бактерий рода *Bacillus* – мелкие бесцветные или с оттенком от слабо-розового до красноватого колонии)
	Среда Гаузе №2	Чашки Петри	(37 ± 1) °С 8 сут	Аэробные микроорганизмы	Не должно быть роста бактерий-контаминантов (возможен рост бактерий

					рода *Bacillus* – шероховатые с фестончатыми краями розовато-бежевые и гладкие белые колонии)
	Кровяной агар	Чашки Петри	(37 ± 1) °С 24-48 ч	Аэробные микроорганизмы	Не должно быть роста бактерий-контаминантов (возможен рост бактерий рода *Bacillus* – шероховатые с фестончатыми краями серовато-розовые и гладкие бежево-коричневые колонии, без гемолиза)
	Среда с мочевиной и индикатором Андреде или по Преусу	Пробирки	(37 ± 1) °С 72 ч	Бактерии рода *Proteus*	Не допускается изменение цвета среды (возможен рост бактерий рода *Bacillus* - мелкие бесцветные колонии, возможно покраснение среды)
	Желточно-солевой агар (или среда №10 или солевой агар)	Чашки Петри	(37 ± 1) °С 72 ч	Стафилококки	Не должно быть роста бактерий-контаминантов (возможен рост бактерий рода *Bacillus* - круглые белые, хорошо снимающиеся колонии)

Примечание: При появлении сомнительных колоний производят микроскопическое исследование.

12. Определение микробиологической чистоты воды

12.1. Вода для инъекций (англо)

Общее число аэробных микроорганизмов (бактерий и грибов) не более 10 КОЕ в 100 мл.

Для анализа микробиологической чистоты воды для инъекций отбирают образец в объеме не менее 1000,0 мл.

Исследование проводят методом мембранной фильтрации в асептических условиях. Для посева используют мембранные фильтры из нитроцеллюлозы с диаметром пор не более 0,45 мкм и внешним диаметром 47 мм. Для смачивания фильтра применяют стерильный 0,9 % раствор натрия хлорида (не менее 5 мл).

Для определения общего числа аэробных микроорганизмов фильтруют 100 мл воды для инъекций в двойной повторности. После окончания фильтрации каждый фильтр переносят в чашки Петри на поверхность агаризованной среды R2A следующего состава:

• Гидролизат казеина	0,5 г
• Дрожжевой экстракт	0,5 г
• Протеозный пептон	0,5 г
• Глюкоза	0,5 г
• Крахмал растворимый	0,5 г
• Калия гидрофосфат	0,3 г
• Магния сульфат	0,024 г
• Натрия пируват	0,3 г
• Агар микробиологический	15,0 г
• Вода очищенная	1000,0 мл
pH после стерилизации	7,2 ± 0,2

Посевы инкубируют в термостате при температуре (32,5 ± 2,5) ^{o}C в течение 5 сут. Производят подсчет колоний через 48 – 72 ч (предварительные результаты), через 5 сут (окончательные результаты) и определяют среднее арифметическое число аэробных микроорганизмов (бактерий и грибов суммарно) в 100 мл воды.

Для определения общего числа аэробных микроорганизмов допустимо использовать соево-казеиновый агар или среду № 1 для выделения бактерий, агар Сабуро или среду № 2 – для выращивания грибов.

12.2. Вода очищенная

Общее число аэробных микроорганизмов (бактерий и грибов) не более 100 КОЕ в 1 мл. Отсутствие *Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa* в 100 мл*.

Примечание.

* - Определение *E.coli, S.aureus, P.aeruginosa* проводят на основании анализа рисков.

Для анализа микробиологической чистоты воды очищенной отбирают образец в объеме не менее 1000 мл.

Для определения общего числа аэробных микроорганизмов фильтруют следующие объемы воды очищенной: 1 мл, 10 мл и 100 мл (в двойной повторности). Допускается для проведения испытания использовать один объем воды, выбранный в соответствии с получаемыми результатами.

Далее определение общего количества микроорганизмов выполняют в соответствии с п.12.1.

При необходимости для определения *E.coli, S.aureus, P.aeruginosa* фильтруют 100 мл воды в двойной повторности. В соответствии с получаемыми результатами для определения каждого микроорганизма допустима фильтрация 200 мл воды очищенной через один фильтр.

После окончания фильтрации 2 фильтра переносят в чашки Петри на поверхность агаризованной среды Эндо (среда № 4). Посевы инкубируют при температуре (32,5 ± 2,5) ^{o}C в течение 24 ч. Микроскопируют малиново-красные колонии с металлическим блеском или без него, окруженные малиновыми зонами преципитации, неслизистые. При обнаружении в мазках грамотрицательных палочек отдельные колонии отсевают на скошенный в пробирках соево-казеиновый агар (среду № 1) и инкубируют в течение 18 – 24 ч. После инкубации проводят идентификацию в соответствии с п.8*. Если

обнаружены грамотрицательные неспорообразующие бактерии в виде палочек, не содержащие фермент цитохромоксидазу, не утилизирующие натрия цитрат и образующие индол, считают, что образец воды контаминирован *E. coli*.

Следующие 2 мембранных фильтра переносят в чашки Петри на поверхность агаризованной среды № 9. Посевы инкубируют при температуре (32,5 ± 2,5) °С в течение 24 – 48 ч. При наличии на фильтрах, помещенных на среду № 9, колоний бактерий, выделяющих в агар сине-зеленый пигмент пиоцианин, проводят микроскопирование и идентификацию в соответствии с п.8*. Если обнаружены грамотрицательные неспорообразующие бактерии в виде палочек, выделяющие сине-зеленый пигмент пиоцианин, обладающие ферментом цитохромоксидазой и растущие при температуре (42 ± 1) °С, считают, что образец воды контаминирован *P. aeruginosa*.

Для определения *S. aureus* 2 мембранных фильтра переносят в чашки Петри на поверхность питательной среды – маннитно-солевой агар или среда № 10 – и инкубируют в течение 24 – 48 ч. Золотисто-желтые колонии, окруженные желтыми зонами, отсевают на соево-казеиновый агар или среду № 1. Проводят микроскопирование и идентификацию в соответствии с п.8*. Если обнаружены грамположительные кокки, расположенные в виде гроздьев, ферментирующие маннит (маннитно-солевой агар, среда № 10), содержащие фермент коагулазу, считают, что образец воды контаминирован *S. aureus*.

Примечание.

* - Для идентификации могут быть использованы другие методы (тест-системы, автоматические анализаторы и др.).

Стерильность ОФС. 1.2.4.0003.15

Настоящая общая фармакопейная статья описывает проведение испытания на стерильность различных лекарственных средств (ЛС) – препаратов для инъекций, инфузий, глазных капель, пленок, фармацевтических субстанций и вспомогательных веществ, включая биологические лекарственные препараты, в том числе, иммунобиологические лекарственные препараты (ИЛП) и их растворители, которые в соответствии с нормативной документацией или фармакопейными статьями должны быть стерильными.

Удовлетворительный результат не может служить доказательством стерильности всей партии, а свидетельствует лишь о том, что в анализируемом образце в условиях испытания не обнаружено бактерий и грибов.

Условия проведения испытания

Испытание на стерильность проводят в асептических условиях в ламинарных установках, чистых помещениях или изоляторах класса чистоты А. Меры, предотвращающие контаминацию, не должны оказывать губительного влияния на микроорганизмы, которые могут содержаться в испытуемых образцах. Условия проведения испытания регулярно

контролируют в соответствии с соблюдением надлежащих правил производства и лабораторной практикой.

Методы испытания стерильности

Испытание на стерильность проводят методом прямого посева или методом мембранной фильтрации. Метод мембранной фильтрации используют во всех случаях, когда природа препарата, его физико-химические свойства позволяют фильтровать его через мембранные фильтры.

Метод прямого посева используют для испытания на стерильность ЛС, не обладающих антимикробным действием или антимикробное действие которых можно устранить разведением или инактивированием, а также для препаратов, испытание которых невозможно выполнить методом мембранной фильтрации.

При испытании на стерильность параллельно проводятся соответствующие отрицательные контроли.

1. Проверка пригодности методики испытания (определение антимикробного действия)

Проверку пригодности методики испытания на стерильность следует проводить в следующих случаях:

а) при проведении испытания на стерильность нового препарата;

б) при внесении любых изменений в экспериментальные условия испытания;

в) в случае изменения состава препарата или технологии его производства.

Для проверки антимикробного действия используют те же тест-штаммы, что и при оценке ростовых свойств питательных сред (Таблица 3).

Определение антимикробного действия проводят теми же методами и в тех же условиях, что и испытание на стерильность.

Мембранная фильтрация. Проверка пригодности (определение антимикробного действия) может выполняться одновременно с испытанием на стерильность испытуемого препарата (п. 2.2.). После переноса требуемого

количества испытуемого препарата на фильтр в последнюю порцию жидкости для промывания вносят не более 100 колониеобразующих единиц (КОЕ) тест-штаммов микроорганизмов (п. 2.2.8.).

Прямой посев. При проверке пригодности (определении антимикробного действия) готовят взвеси тест-штаммов с конечной концентрацией не более 100 КОЕ в 1 мл. Испытание проводят с каждым видом микроорганизмов.

Используют по 4 пробирки для каждого тест-штамма с 10 или 20 мл (для ИЛП) соответствующей питательной среды. В первые две пробирки вносят по 1 мл испытуемого образца, а в две другие – по 1 мл растворителя (положительный контроль). Во все четыре пробирки вносят по 1 мл соответствующего тест-штамма.

Посевы на тиогликолевой среде инкубируют при температуре 32,5 ± 2,5^{o} С в течение 3 сут. Посевы на жидкой соево-казеиновой среде или жидкой среде Сабуро инкубируют при температуре 22,5 ± 2,5^{o} С в течение 5 суток.

Учет результатов проводят визуально в проходящем свете, сравнивая рост тест-штаммов микроорганизмов в опытных и контрольных посевах. Если обнаруженный рост в опытных пробирках визуально сравним с ростом в контрольных посевах, не содержащих испытуемый препарат, делают вывод о том, что препарат в условиях испытания не обладает антимикробным действием. В этом случае испытание на стерильность проводят стандартными методами.

В случае если в контроле наблюдают рост тест-штамма, а в опыте рост отсутствует, считают, что испытуемый препарат обладает антимикробным действием, которое следует устранить.

1.1. Устранение антимикробного действия препарата

Для устранения антимикробного действия препарата используют следующее:

А) Увеличивают разведение препарата, взяв больший объем растворителя/разбавителя/питательной среды (но не более 200 мл). Для ИЛП допускается только разбавление питательной средой.

Экспериментально установленное соотношение объемов питательной среды и посевного материала, обеспечивающее нейтрализацию антимикробного действия препарата, должно соблюдаться при испытании препарата на стерильность.

Б) Применяют метод мембранной фильтрации с последующим промыванием фильтров, если препарат растворим в водных разбавителях или в изопропилмиристате (ИПМ).

В) Вместо стандартного разбавителя можно использовать стерильную нейтрализующую жидкость, промышленного производства или приготовленную в лаборатории, следующего состава:

- Твина-80 -30,0 г
- Лецитина яичного -3,0 г
- L-гистидина гидрохлорида -1,0 г
- Пептона (мясного или казеинового) -1,0 г
- Натрия хлорида -4,3 г
- Калия фосфата однозамещенного -3,6 г
- Натрия фосфата двузамещенного -7,2 г
- Воды очищенной -1000 мл

  pH 7,0±0,2

Г) Используют неспецифические инактиваторы. Для инактивации консервантов, входящих в состав ряда лекарственных препаратов, в разбавитель и/или в питательные среды до стерилизации вносят следующие неспецифические инактиваторы: 3% твина-80 или 0,3% лецитина (яичного или соевого) от объема среды. В случае, если в препарате имеется более двух консервантов различной химической структуры, в среду вносят 3% твина-80, 0,3% лецитина, 0,1% L-гистидина и 0,5% натрия тиосульфата одновременно.

Если разведение в вышеприведенном растворе не инактивирует антимикробные свойства ЛС, увеличивают концентрацию твина-80 или лецитина.

Некоторые инактиваторы антимикробного действия ЛС указаны в Таблице 4 ОФС «Микробиологическая чистота».

Учитывая, что в состав тиогликолевой среды входит тиогликолят натрия − инактиватор ртутных соединений, перед проведением испытаний ИЛП, содержащих ртутные консерванты, методом прямого посева, проводят определение нейтрализующих свойств этой среды, подтверждающее инактивацию.

Для нейтрализации действия других консервантов, входящих в состав ИЛП, инактиваторы не используются, а основным способом устранения их действия является разведение питательной средой. Посев испытуемого препарата в питательную среду проводят в соотношении 1:20, с учетом результатов определения антимикробного действия препарата.

Д) Применяют специфические инактиваторы, нейтрализующие антимикробное действие ЛС, но не угнетающие рост микроорганизмов.

Для инактивации пенициллинов и цефалоспоринов, независимо от их лекарственной формы, в буферный раствор, используемый для растворения, суспендирования или эмульгирования образца, а также в питательные среды перед их применением, асептически вносят стерильный раствор β-лактамазы в количестве, указанном в фармакопейной статье или нормативной документации.

Ингибирующее действие β-лактамазы на пенициллины и цефалоспорины необходимо определять, внося в среды с ферментом и антибиотиком от 50 до 100 КОЕ *S.aureus*. Типичный рост тест-штамма в питательной среде служит подтверждением того, что концентрация фермента β-лактамазы достаточна.

Для инактивации сульфаниламидных препаратов, независимо от их лекарственной формы, в буферный раствор, используемый для растворения,

суспендирования или эмульгирования образца, а также в питательные среды, если необходимо, до стерилизации вносят парааминобензойную кислоту (ПАБК) из расчета 0,05 - 0,1 г/л среды.

При разработке новых препаратов в фармакопейную статью и нормативную документацию следует включать сведения о наличии/отсутствии антимикробного действия препарата с рекомендациями по его устранению и информацию о методе его испытания на стерильность. В случае изменения технологического процесса или состава препарата необходимо подтвердить отсутствие антимикробного действия.

2. ИСПЫТАНИЕ НА СТЕРИЛЬНОСТЬ

2.1. Отбор образов для испытания

При проведении испытания на стерильность число контролируемых первичных упаковок определяется с учетом общего количества единиц в серии. Отбирают образцы препарата, как указано в Таблице 1.

Испытание на стерильность в процессе производства ИЛП проводят в соответствии с регламентом производства.

При необходимости, могут быть регламентированы особые требования в отношении необходимого количества контролируемых емкостей, обеспечивающие надежность контроля стерильности препарата.

Для посева на соответствующую питательную среду используют образец в количестве, приведенном в Таблице 2.

Таблица 1 - Количество единиц препарата для проведения испытания на стерильность в зависимости от объема серии

Количество единиц (ампул, флаконов и др.) в серии*	Минимальное количество единиц (ампул, флаконов и др.) для посева на каждую питательную среду**
Лекарственные средства	
1.Парентеральные лекарственные средства:	
• Не более 100	10 % или 4
• От 100 до 500	10
• Более 500	2 % или 20
• Парентеральные лекарственные средства большого объема (более 100)	2 % или 10
• Антибиотики, твердые формы, ангро, (более 5 г)	6

2.Неинъекционные лекарственные средства (в том числе глазные):	
• Не более 200	5 % или 2
• Более 200	10
• Препараты в однодозовой упаковке	См. графу «Парентеральные лекарственные средства»
3.Твердые формы, англо:	
• Не более 4 упаковок	Каждую
• Свыше 4, но не более 50	20 % или 4
• Свыше 50	2 % или 10

* если количество единиц в серии неизвестно, то используют максимальное количество, указанное в колонке.

** если содержимого одной емкости ЛС (кроме ИЛП) достаточно для инокулирования двух питательных сред, то в этой колонке приводится количество образцов, необходимых для испытания на стерильность на двух питательных средах.

Таблица 2 - Минимальное количество испытуемого препарата для посева на питательные среды

Количество препарата в первичной упаковке	Минимальное количество препарата для посева на каждую питательную среду
Жидкие	
• Менее 1 мл	весь объем первичных упаковок, объединенных до 1 мл
• 1 – 40 мл	½ содержимого, но не менее 1 мл
• 40 – 100 мл	20 мл
• более 100 мл	10 % содержимого, но не менее 20 мл
• Антибиотики (жидкости)	1 мл
• Другие препараты, растворимые в воде или ИПМ	содержимое упаковки, но не менее 200 мг
Нерастворимые препараты, мази и кремы, поддающиеся эмульгированию или суспендированию	содержимое упаковки, но не менее 200 мг
Твердые	
• Менее 50 мг	все содержимое
• 50 - 300 мг	½ содержимого, но не менее 50 мг
• 300 мг – 5 г	150 мг
• более 5 г	500 мг

2.2. Метод мембранной фильтрации

При определении стерильности ЛС, обладающих выраженным антимикробным действием, и ЛС в емкостях вместимостью более 100 мл, предпочтительным является метод мембранной фильтрации. Исключение составляют препараты с антимикробным действием, нерастворимые в водных разбавителях или ИПМ.

Процедура испытания на стерильность методом мембранной фильтрации состоит из следующих основных стадий: смачивание мембран, подготовка образцов и фильтрация содержимого всех емкостей через мембранные фильтры, отмывка мембранных фильтров соответствующим стерильным раствором, добавление питательной среды и инкубирование посевов.

Испытание выполняют с использованием фильтрационных установок открытого или закрытого типа, позволяющих в асептических условиях переносить и фильтровать испытуемый препарат через мембранные фильтры (внешний диаметр 47 мм; диаметр пор 0,45 мкм), способные улавливать микроорганизмы. Фильтрационная установка открытого типа должна быть смонтирована таким образом, чтобы испытуемый образец можно было внести и профильтровать в условиях асептики. После окончания фильтрации мембрану асептически переносят в питательную среду. При использовании закрытой стерильной системы с мембраной, вмонтированной в канистру, после фильтрации питательную среду вносят непосредственно в канистру на мембрану. Фильтры из нитратцеллюлозы используют для водных, масляных и слабых спиртовых растворов, фильтры из ацетатцеллюлозы – для концентрированных спиртовых растворов и кислот. Гидрофобный край фильтра и низкая сорбционная способность обеспечивают эффективную отмывку мембраны и сводят к минимуму адсорбцию препарата, обладающего антимикробным действием.

Для препаратов, не обладающих антимикробным действием, можно использовать фильтры без гидрофобного края, смачивая их перед фильтрацией используемым разбавителем.

Если испытуемый препарат не обладает антимикробным действием, в ходе испытания возможно исключить процедуру промывания фильтров.

2.2.1. Испытание водных растворов ЛС

Определенный объем препарата, стерильно отобранный из всех образцов, перемешивают и асептически переносят на один или несколько

предварительно смоченных фильтров. Фильтры асептически снимают с фильтродержателя и помещают в среды или заливают их в емкости с фильтродержателями. При использовании замкнутой системы канистры заполняют равным объемом сред. При этом следует избегать аэрации тиогликолевой среды.

2.2.2. Испытание жидких препаратов, не смешивающихся с водой

Испытание проводят так же, как и для водных растворов ЛС. При испытании вязких жидкостей к общей пробе перед фильтрацией асептически добавляют достаточное количество подходящего стерильного растворителя для увеличения скорости фильтрации.

Если в состав испытуемого препарата входит лецитин, масло или консервант, а сам препарат обладает антимикробным действием, для промывания фильтров используют жидкость №2.

2.2.3. Пробоподготовка мазей, кремов, растворимых в ИПМ, и растворов в маслах

Мази на жировой основе и эмульсии типа «вода в масле» растворяют в ИПМ, предварительно простерилизованном методом фильтрации (мембрана с диаметром пор 0,22 мкм). Стерильный разбавитель/растворитель и, если необходимо, испытуемый препарат, непосредственно перед фильтрацией нагревают до температуры не более 44^{o} С. Первоначально через мембрану пропускают стерильный ИПМ в количестве 5 мл. Затем фильтруют раствор препарата в ИПМ. Для максимальной эффективности процесса во время фильтрации над фильтром постоянно должен быть слой раствора. После фильтрации мембрану промывают тремя порциями жидкости №2 по 100 мл каждая. Испытание проводят на питательных средах с добавлением 1 г/л твина-80.

Если в состав испытуемого препарата входит вазелин, для промывания фильтров используют жидкость №3. Перед началом фильтрации через фильтр пропускают 5,0 мл стерильного ИПМ. Для максимальной эффективности процесса во время фильтрации над фильтром постоянно

должно быть небольшое количество теплого раствора. После фильтрации образца фильтр промывают тремя порциями жидкости №3 по 100 мл каждая. Фильтры помещают в питательные среды, как указано ранее.

Если препарат представляет собой раствор в масле, фильтр и установка перед применением должны быть тщательно высушены.

2.2.4. Испытание препаратов в шприц-тюбиках

Содержимое каждого шприц-тюбика переносят в установки для мембранной фильтрации или собирают общую пробу в стерильную пробирку для последующего переноса на фильтр.

2.2.5. Испытание твердых форм лекарственных средств для инъекций (кроме антибиотиков)

Препарат разводят, как указано в инструкции по применению, и проводят испытание согласно методике, приведенной в разделах 2.2.1. и 2.2.2.

Лиофилизированные ИЛП предварительно растворяют стерильным растворителем в соответствии с инструкцией по применению, стерильным 0,9% раствором натрия хлорида, водой для инъекций или другим растворителем с учетом результатов валидации методики испытания на стерильность.

2.2.6. Испытание стерильных аэрозольных препаратов

Требуемое количество препарата в аэрозольной упаковке асептически переносят в стерильную колбу нажатием на шток распылительного клапана. Если возможно, удаляют пропеллент путем испарения. Добавляют в колбу жидкость №2 и осторожно перемешивают. Испытание проводят, как указано в разделах 2.2.1. и 2.2.2.

2.2.7. Жидкости для промывания мембранных фильтров при испытании лекарственных средств, обладающих антимикробным действием

Для промывания фильтров можно использовать любую стерильную жидкость, не подавляющую рост микроорганизмов:

- 0,9% раствор натрия хлорида pH 7,0±0,2 (после стерилизации).
- Жидкость №1: растворяют 1 г ферментативного пептона в 1000 мл воды, фильтруют или центрифугируют для осветления, разливают в сосуды и стерилизуют; pH 7,0±0,2.

При фильтрации образцов пенициллинов или цефалоспоринов (если необходимо) к жидкости №1 добавляют валидированное количество β-лактамазы, указанное в фармакопейной статье и нормативной документации, достаточное для инактивации остаточного антимикробного действия антибиотика на фильтре.

- Жидкость №2: добавляют 1 мл твина-80 к 1000 мл жидкости №1, разливают в сосуды и стерилизуют; pH 7,0±0,2
- Жидкость №3: растворяют 5 г ферментативного пептона, 3 г мясного экстракта и 10 г твина-80 в 1000 мл воды, разливают во флаконы и стерилизуют; pH 7,0±0,2.

При испытании ИЛП промывку мембранных фильтров можно проводить любым стерильным раствором, не подавляющим рост микроорганизмов, использованным при определении антимикробного действия препарата, например: 0,9 % раствор натрия хлорида (pH 7,0±0,2) или жидкость № 1.

2.2.8. Проверка пригодности метода мембранной фильтрации при испытании ЛС, обладающих антимикробным действием

Фильтруют объем испытуемого образца, используя для одного фильтра то же количество единиц (ампул, флаконов и т.д.), что и в испытании на стерильность (Таблица 2). Фильтр промывают, как минимум, тремя порциями соответствующей жидкости по 100 мл каждая. В последнюю порцию жидкости для промывания вносят по 1 мл приготовленных взвесей тест-штаммов микроорганизмов (каждого в отдельности) с концентрацией не более 100 КОЕ/мл (Таблица 3).

Фильтр помещают в емкость со 100 мл соответствующей питательной среды или добавляют среду в канистру замкнутой системы. Посевы инкубируют при соответствующей температуре в течение не более 3 сут для бактерий и 5 сут для грибов.

В ходе учета результатов определяют визуально в проходящем свете наличие роста тест-штаммов микроорганизмов. В случае обнаружения роста считают, что антимикробное действие полностью инактивировано и проводят испытание на стерильность, используя то же количество препарата, аналогичный объем жидкости для промывания и те же питательные среды.

Если рост тест-штаммов микроорганизмов отсутствует, делают вывод, что антимикробное действие препарата не инактивировано. Испытание повторяют, увеличивая объем жидкости для промывания фильтра (но не более 500 мл) или используют другие способы нейтрализации (п. 1.1).

2.3. Метод прямого посева

Метод прямого посева используют для испытания на стерильность ЛС, не обладающих антимикробным действием, или тех препаратов, испытание которых невозможно выполнить методом мембранной фильтрации.

В том случае, если препарат обладает антимикробным действием в условиях испытания, его нейтрализуют путем добавления подходящих инактиваторов или увеличивая объем питательной среды (п. 1.1). Добавляемый инактиватор в заданной концентрации не должен подавлять рост тест-штаммов. При необходимости инактиватор можно добавлять и в питательную среду.

Испытуемые образцы засевают в питательные среды в соотношении 1:10 или 1:20. Соотношение количества испытуемого материала и используемой питательной среды должно быть определено при проверке антимикробного действия препарата.

Для ИЛП, вызывающих помутнение питательной среды (препараты, содержащие сорбент, микробные клетки* и др.), когда визуально нельзя определить наличие или отсутствие роста микроорганизмов или возникают

сомнения при учете результатов, посев производят по указанной выше схеме, а на 5-7 сут производят пересев на свежую питательную среду. Все посевы выдерживают при соответствующей температуре до окончания инкубации (14 сут со дня первичного посева).

Примечание.

* - Испытание живых бактериальных вакцин осуществляют в соответствии с требованиями нормативной документации.

2.3.1.Испытание нефильтрующихся жидкостей

Из определенного количества флаконов, ампул и т.д. (Таблица 1) асептически отбирают объем препарата, достаточный для посева на питательные среды в соотношении 1:10. После посева аккуратно перемешивают среду, исключая аэрацию.

2.3.2. Испытание мазей, кремов и растворов в маслах

От каждой испытуемой серии отбирают необходимое количество единиц (Таблица 1).

Растворы в маслах. Готовят эмульсию препарата в разведении 1:10, помещая в стерильную колбу, содержащую соответствующий стерильный разбавитель, стеклянные бусы диаметром 5-6 мм, и, при необходимости, определенное количество твина-80.

Посевы растворов в маслах ежедневно аккуратно перемешивают.

Мази и кремы. Тубы (флаконы) перед испытанием дезинфицируют, вскрывают их асептически и первую порцию препарата удаляют, не исследуя.

Мази и кремы, легко эмульгируемые в воде. Готовят разведение ЛС 1:10, помещая образец в стерильную колбу с соответствующим стерильным разбавителем (например, раствором 0,9% натрия хлорида или жидкостью №1) и стеклянными бусами диаметром 5-6 мм. Смесь нагревают на водяной бане до температуры 40^{o}С и энергично встряхивают в течение 5-15 минут до получения гомогенной эмульсии, которую высевают в жидкие среды – тиогликолевую, соево-казеиновую или Сабуро.

Мази и кремы, трудно смешиваемые с водой. Готовят разведение препарата 1:10, помещая в стерильную колбу с соответствующим стерильным разбавителем (например, раствором 0,9% натрия хлорида или жидкостью №3), твином-80 в количестве 50% от массы навески и стеклянными бусами диаметром 5-6 мм. Смесь нагревают на водяной бане до температуры 40°С (в исключительных случаях до температуры 45°С), энергично встряхивают в течение 5-15 мин (максимально 30 мин), до получения гомогенной эмульсии, которую затем высевают в жидкие среды – тиогликолевую, соево-казеиновую или Сабуро.

2.3.3. Испытание твердых форм

ЛС в виде порошка переносят в количестве, указанном в Таблице 2, в жидкие среды – тиогликолевую, соево-казеиновую или Сабуро и осторожно перемешивают. Если в образец добавлен стерильный растворитель, то испытанию на стерильность подвергают полученную суспензию.

2.4. Условия инкубации посевов

Посевы инкубируют не менее 14 сут при температуре 32,5 ± 2,5°С в жидкой тиогликолевой среде и при температуре 22,5 ± 2,5°С в жидких соево-казеиновой среде или среде Сабуро (независимо от метода посева).

При испытании ИЛП возможно использование только тиогликолевой среды и инкубирование посевов при двух температурных режимах 32,5 ± 2,5 °С и 22,5 ± 2,5 °С.

2.5. Учет и интерпретация результатов испытания

Во время инкубации периодически просматривают посевы. Наличие роста микроорганизмов определяют визуально в проходящем свете. Если испытуемое ЛС вызывает помутнение питательной среды и визуально нельзя определить наличие или отсутствие микробного роста, через 14 сут после начала испытания переносят не менее 1 мл помутневшей среды в пробирки с аналогичной стерильной средой. Инкубируют исходные и повторные посевы.

Общее время инкубации должно составлять не менее чем 14 + 4 сут от начала испытания.

Для ИЛП, вызывающих помутнение питательной среды, пересев на аналогичную питательную среду производится на 5-7 сут с последующей инкубацией 14 сут со дня первичного посева.

При отсутствии роста микроорганизмов, считают, что испытуемый препарат соответствует требованиям испытания на стерильность.

При обнаружении роста микроорганизмов, определяемого визуально по наличию мутности, осадка, хлопьев и других изменений среды и подтверждаемого микроскопическим исследованием, считают, что испытуемый препарат не соответствует требованиям испытания на стерильность. В этом случае проводят расследование причин несоответствия.

Результаты испытания на стерильность могут быть признаны недостоверными в случае, если выполняется одно или несколько условий, приведенных ниже:

1) получены неудовлетворительные результаты микробиологического контроля окружающей среды (воздушной среды, поверхностей и рук персонала и др.) при проведении испытания на стерильность;
2) выявлены ошибки, допущенные в ходе испытания;
3) обнаружен рост микроорганизмов в отрицательном контроле (контроль стерильного растворителя/разбавителя или питательной среды);
4) питательная среда нестерильна и/или её ростовые свойства неудовлетворительны;
5) выявлены ошибки в ходе процесса стерилизации материалов.

Если результаты испытания признаны недостоверными (в случае обнаружения ошибок в ходе анализа), тест повторяют на том же количестве образцов, что и первоначально, исключая препараты ИЛП, повторное испытание которых проводят на удвоенном количестве образцов.

Если в результате повторного испытания не обнаруживают рост микроорганизмов, считают, что препарат соответствует требованиям

испытания на стерильность. Если в результате повторного испытания обнаруживают рост микроорганизмов, считают, что препарат не соответствует требованиям испытания на стерильность.

Если в ходе расследования доказана правильность выполнения теста на стерильность, считают, что препарат не соответствует требованиям испытания на стерильность.

3. Питательные среды

Для испытания на стерильность используют жидкие среды – тиогликолевую, соево-казеиновую или Сабуро. Тиогликолевую среду применяют для выявления аэробных и анаэробных бактерий. Жидкую соево-казеиновую среду – для выявления грибов и аэробных бактерий. Жидкую среду Сабуро используют для выявления грибов.

При испытании на стерильность ИЛП не рекомендуется использовать жидкую среду Сабуро.

При испытании на стерильность ИЛП, в том числе, содержащих ртутные консерванты, допустимо использование только тиогликолевой среды в качестве универсальной для выявления аэробных и анаэробных бактерий и грибов (при условии предварительного определения её ростовых и нейтрализующих свойств с использованием тест-микроорганизмов в соответствии с Таблицей 3). Инкубацию посевов осуществляют при двух температурных режимах.

3.1. Приготовление питательных сред

Питательные среды готовят в лаборатории, используя сухие питательные среды промышленного производства или отдельные компоненты. Допускается применение сред, готовых к использованию, с сертификатом производителя. Приготовленные в лаборатории питательные среды проверяют на стерильность и определяют их ростовые свойства.

Питательные среды стерилизуют в автоклаве при температуре 121^{o}C в течение 15 мин, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации.

Тиогликолевая среда

- L-цистина - 0,5 г
- Натрия хлорида - 2,5 г
- Глюкозы моногидрата - 5,5 г
- Агара микробиологического (влажность не более 15 %) - 0,75 г
- Дрожжевого экстракта (водорастворимого) - 5,0 г
- Панкреатического гидролизата казеина - 15,0 г
- Натрия тиогликолята - 0,5 г
  или кислоты тиогликолевой - 0,3 г
- Раствора резазурина натрия (1:1000), свежеприготовленного - 1,0 мл
- Воды очищенной - 1000,0 мл

pH после стерилизации 7,1 ± 0,2.

Добавляют в воду очищенную L-цистин, агар микробиологический, натрия хлорид, глюкозу, водорастворимый дрожжевой экстракт и панкреатический гидролизат казеина и нагревают до полного растворения. После этого вносят натрия тиогликолят или тиогликолевую кислоту и, если необходимо, доводят pH среды 1М раствором натрия гидроксида до необходимого значения. Добавляют раствор резазурина, перемешивают, разливают в пробирки соответствующего объема и стерилизуют.

Жидкая соево-казеиновая среда

- Панкреатического гидролизата казеина - 17,0 г
- Папаинового гидролизата соевой муки - 3,0 г
- Натрия хлорида - 5,0 г
- Калия фосфата двузамещенного - 2,5 г
- Глюкозы - 2,5 г
- Воды очищенной - 1000,0 мл

pH после стерилизации 7,3 ± 0,2

Компоненты растворяют в воде (если необходимо – при нагревании). Охлаждают при комнатной температуре. Если требуется, добавляют 1М

раствор натрия гидроксида, чтобы после стерилизации значение pH среды было 7,3 ± 0,2. Фильтруют для получения прозрачной среды, разливают в пробирки и стерилизуют.

Жидкая среда Сабуро

- Пептона ферментативного - 10,0 г
- Глюкозы моногидрата - 40,0 г
- Воды очищенной - 1000,0 мл

pH после стерилизации 5,6 ± 0,2

Пептон и глюкозу добавляют в воду очищенную и полностью растворяют при слабом нагревании. Охлаждают до комнатной температуры и доводят pH до требуемого значения. Если необходимо, фильтруют, разливают в пробирки и стерилизуют.

Допускается, чтобы состав сухих и готовых к применению сред промышленного производства различался, при условии их соответствия требованиям по ростовым свойствам.

3.2. Стерильность питательных сред

После стерилизации не менее 5% емкостей от каждой партии питательной среды помещают в термостат и инкубируют в течение как минимум 14 сут для контроля стерильности параллельно с посевом испытуемого образца на стерильность. Рост микроорганизмов должен отсутствовать.

3.3. Определение ростовых свойств питательных сред

Ростовые свойства сред определяют для каждой серии питательной среды, выпущенной промышленностью и имеющей номер, и для каждой партии среды, изготовленной в лаборатории.

Каждый вид микроорганизма в количестве не более 100 КОЕ/мл вносят в отдельную порцию испытуемой среды (в 2 пробирки). Инкубируют в соответствии с условиями, указанными в Таблице 3. Если в течение

необходимого времени инкубации в инокулированных средах визуально отмечается рост микроорганизмов, среду считают пригодной для использования.

3.3.1. Подготовка тест-штаммов микроорганизмов

Используют тест-штаммы бактерий и грибов из специализированных коллекций, которые должны быть типичными по культурально-морфологическим и биохимическим свойствам.

Число пассажей рабочих культур не должно превышать пяти.

Перед испытанием культуры аэробных бактерий высевают на скошенный соево-казеиновый агар, среду №1 или другую адекватную плотную питательную среду; культуры грибов *C.albicans* и *A. brasiliensis* – на скошенный агар Сабуро (или среду №2); культуры анаэробов *Clostridium novyi* и *C. sporogenes** – на среды для анаэробных микроорганизмов (например, жидкую тиогликолевую) и инкубируют при соответствующей температуре.

* Возможен высев культуры на среды для аэробов при условии инкубации в анаэростате.

3.3.2. Приготовление инокулята

Выросшие культуры тест-штаммов бактерий (в том числе, *C.sporogenes*, выращенную в анаэробных условиях) и *C. albicans* смывают с поверхности скошенного агара стерильным 0,9% раствором натрия хлорида. Готовят взвесь каждого тест-штамма, соответствующую 10 ЕД по оптическому стандартному образцу мутности.

Таблица 3 - Тест-штаммы микроорганизмов, используемые для определения ростовых свойств питательных сред и проверки антимикробного действия препарата*

Питательные среды	Тест-штаммы микроорганизмов	Условия инкубации	
		Температура	Время
Жидкая тиогликолевая среда	**Аэробные бактерии:**	32,5 ± 2,5°С	3 сут
	Bacillus subtilis ГКПМ 010011, АТСС 6633, NCTC 10400, DSM 347		

	или *Bacillus cereus* ГКПМ 010014, АТСС 10702, NCTC 8035, DSM 487		
	Staphylococcus aureus ГКПМ 201108, АТСС 6538, NCTC 10788		
	Pseudomonas aeruginosa ГКПМ 190155, АТСС 9027, NCTC 12924, CIP 82.118		
	Alcaligenes faecalis 415** ГКПМ 300205		2 сут
	Анаэробные бактерии:		3 сут
	Clostridium sporogenes 272 ГКПМ 300524, АТСС 19404, NCTC 12935, DSM 1446		
	Clostridium novyi 198** ГКПМ 242484		2 сут
	Грибы:**	22,5 ± 2,5°С	5 сут
	Candida albicans ГКПМ 303903; ГКПМ 303901, АТСС 10231 РКПГУ 401/NCTC 885-653; NCPF 3179		
Жидкая соево-казеиновая среда	**Аэробные бактерии:**	32,5 ± 2,5°С	3 сут
	Bacillus subtilis ГКПМ 010011, АТСС 6633, NCTC 10400, DSM 347 или *Bacillus cereus* ГКПМ 010014, АТСС 10702, NCTC 8035, DSM 487		
	Грибы:	22,5 ± 2,5°С	5 сут
	Candida albicans, ГКПМ 303903; ГКПМ 303901, АТСС 10231 РКПГУ 401/NCTC 885-653; NCPF 3179		
	Aspergillus brasiliensis ATCC 9642, АТСС 16404, РКПГF 106, ВКМ F-1119, ВКМ F-3882, NCPF 2275		
Жидкая среда Сабуро	**Грибы:**	22,5 ± 2,5°С	5 сут
	Candida albicans, ГКПМ 303903; ГКПМ 303901, АТСС 10231 РКПГУ 401/NCTC 885-653; NCPF 3179		
	Aspergillus brasiliensis ATCC 9642, АТСС 16404, РКПГF 106, ВКМ F-1119, ВКМ F-3882, NCPF 2275		

*****могут быть использованы и другие тест-штаммы из различных коллекций, типичные по культурально-морфологическим, тинкториальным и биохимическим свойствам. Набор тест-штаммов может быть изменен в зависимости от способа применения или состава испытуемого препарата.

****** обозначены тест-штаммы для случаев использования тиогликолевой среды в качестве универсальной при испытании ИЛП. Культивирование производят при двух температурных режимах –32,5±2,5°С и 22,5±2,5°С.

Концентрацию клеток *B. subtilis, C. albicans*, *A. brasiliensis* доводят до $1x10^7$ КОЕ/мл; *S. aureus, P. aeruginosa, C. sporogenes, A. faecalis* – до $1x10^9$ КОЕ/мл. Культуру *C.novyi,* выращенную на жидкой среде культивирования для анаэробных микроорганизмов (2 пересева), после центрифугирования 3000 об/мин в течение 20 мин разводят стерильной жидкостью следующего состава:

- натрия хлорид - 8,5 г,
- кислота тиогликолевая - 0,3 мл,
- вода очищенная - 1000 мл,

pH 7,2±0,2 после стерилизации

Для смыва конидий *A. brasiliensis* используют стерильный 0,9% раствор натрия хлорида, содержащий 0,05% твина-80. Количество конидий в 1 мл смыва определяют с помощью камеры Горяева или посевом подходящего разведения на агар Сабуро или среду №2.

Стандартизованные взвеси бактерий и грибов доводят стерильным 0,9% раствором натрия хлорида методом последовательных разведений до концентрации не более 100 КОЕ/мл для посева в жидкие и полужидкие питательные среды для определения их ростовых свойств.

Для подтверждения полученной концентрации инокуляты бактерий, в том числе, *C. sporogenes* (при условии инкубации последнего в анаэростате), высевают на соево-казеиновый агар (среду №1 или специализированную среду для клостридий соответственно) по 0,1 мл из взвеси с концентрацией 10^3 КОЕ/мл, *C. novyi* – на специальную среду для клостридий. Инокуляты грибов высевают на агар Сабуро (или среду №2).

Допускается использование готовых к применению коммерческих систем, представляющих собой субстраты, содержащие определенное количество микробных клеток.

3.4. Определение нейтрализующих свойств тиогликолевой среды

При проведении испытаний ИЛП, содержащих мертиолят (тиомерсал), для определения нейтрализующих свойств тиогликолевой среды используют тест-штамм *Alcaligenes faecalis* 415 (подготовка инокулята см п. 3.3.2.) Предварительно перед посевом культуры в каждую пробирку в середину столбика с тиогликолевой средой вносят по 0,5 мл свежеприготовленного 0,01% раствора тиомерсала, разведенного стерильным 0,9% раствором натрия хлорида.

Тиогликолевую среду признают пригодной по нейтрализующим свойствам, если не позднее 5 суток инкубации посевов при температуре 32,5 ± 2,5° С визуально обнаруживается рост тест-штамма *A. faecalis* 415.

3.5. Хранение питательных сред

Приготовленные в лаборатории среды хранят при температуре от 2 до 25° С в защищенном от света месте в течение не более 1 мес или в течение иного срока и условий хранения, подтвержденного в ходе валидационных испытаний.

В случае, если при хранении тиогликолевой среды, содержащей резазурин, верхний слой среды (более 1/3 объема) окрасится в розовый цвет, среду можно регенерировать нагреванием на кипящей водяной бане в течение 10-15 мин до исчезновения розовой окраски с последующим быстрым охлаждением. Если окраска не исчезает после нагревания, среду считают непригодной к применению. Регенерацию среды можно проводить только один раз.

Питательные среды промышленного производства, готовые к использованию, хранят в плотно укупоренных емкостях при условии сохранения их стерильности и ростовых свойств в течение срока годности.

Сухие питательные среды промышленного производства хранят в соответствии с инструкцией по применению и уничтожают по истечении срока годности, указанного производителем.

Аномальная токсичность **ОФС.1.2.4.0004.15**

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на метод определения аномальной токсичности лекарственных средств.

Основная методика испытания

Испытание проводят на 5 здоровых белых нелинейных мышах обоего пола массой 19-21 г, которые ранее не использовались в экспериментах. Условия содержания и кормления должны обеспечивать нормальную жизнедеятельность животных. Испытуемый образец растворяют или разводят (в случае необходимости) раствором натрия хлорида 0,9% для инъекций или водой для инъекций. Тест-доза должна содержаться в объеме 0,5 мл испытуемого раствора, который вводят в хвостовую вену животного со скоростью 0,1 мл в секунду. Тест-дозу указывают в фармакопейной статье. Период наблюдения за животными составляет 48 ч.

Если в фармакопейной статье даны иные указания, то следуют им.

Испытуемый образец считают прошедшим испытание, если в течение предусмотренного срока наблюдения не погибнет ни одно из подопытных животных.

В случае гибели одного животного, эксперимент повторяют на 5 мышах массой 20,0 ± 0,5 г. Если при повторном испытании не погибнет ни одна мышь, испытуемый образец считают прошедшим испытание.

Испытуемый образец не выдерживает испытание, если в течение предусмотренного срока наблюдения погибнет более, чем одно животное.

Испытания иммунобиологических лекарственных средств

Испытания проводят на двух видах животных: на 5 белых мышах массой 18-20 г и/или на двух морских свинках, массой тела 250-300 г. Массу животных определяют в день начала испытания. В испытания берут здоровых животных, которые ранее не использовались в экспериментах. Условия содержания и кормления должны обеспечивать нормальную жизнедеятельность животных.

Испытание на белых мышах

Испытуемый образец вводят каждому из 5 животных внутрибрюшинно в одной максимальной разовой дозе для человека или животного, для которого предназначено лекарственное средство (но не более 1,0 мл), если в нормативной документации нет иных указаний. Лиофилизированный испытуемый образец восстанавливают прилагаемым растворителем в соответствии с указаниями на этикетке. Если испытуемый образец предназначен для внутривенного введения, то его аномальную токсичность определяют при внутривенном введении, при этом испытуемая доза не должна превышать 0,5 мл. Испытуемый образец, вводимый внутривенно, должен иметь температуру 36±1° С.

Период наблюдения за животными составляет 7 сут. Если в частной фармакопейной статье даны иные указания, то следуют им.

Испытуемый образец считают выдержавшим испытание, если в течение всего срока наблюдения:

- отсутствует гибель подопытных животных;
- ни у одного из животных не проявятся признаки интоксикации;
- отсутствует снижение массы тела животных по сравнению с исходной.

Если в фармакопейной статье даны иные указания, то следуют им.

Если более, чем одно животное погибнет, испытуемый образец считают не выдержавшим испытание. Если погибнет одно животное, проявятся признаки интоксикации или будет отмечено снижение массы тела, то испытание повторяют на удвоенном количестве животных. Испытуемый образец признается прошедшим испытание, если ни одно животное из второй группы не погибнет, не проявятся признаки интоксикации и не будет отмечено уменьшение массы тела за период наблюдения.

Испытание на морских свинках

Испытуемый образец вводят 2 животным подкожно в дозе, равной одной максимальной разовой дозе для человека или животного, для которого предназначено лекарственное средство, но не более 5 мл (если в нормативной документации нет иных указаний).

Лиофилизированный испытуемый образец восстанавливают прилагаемым растворителем в соответствии с указаниями на этикетке. Если испытуемый образец предназначен для внутривенного введения, то его аномальную токсичность определяют при внутрибрюшинном введении, при этом вводимая доза не должна превышать 5 мл.

Период наблюдения за животными составляет 7 сут, если в нормативной документации не указаны другие требования.

Испытуемый образец считают выдержавшим испытание, если в течение всего срока наблюдения:

- отсутствует гибель подопытных животных и ни у одного из них не были выявлены видимые признаки интоксикации;
- отсутствует снижение массы тела каждого животного в день окончания наблюдения по сравнению с исходной;
- ни у одного животного, получавшего испытуемый образец подкожно, не развился некроз или абсцесс в месте его введения (возможность развития других проявлений реакции в месте введения испытуемого образца указывают в нормативной документации).

Если в фармакопейной статье даны иные указания, то следуют им.

Испытуемый образец признается прошедшим испытание, если ни у одного из животных не проявятся признаки интоксикации и не будет отмечено уменьшение массы тела.

Если оба животных погибнут, испытуемый образец признается не выдержавшим испытание.

Если в течение периода наблюдения регистрируют гибель одного животного, заболевание, уменьшение массы, развитие некроза или абсцесса в месте введения испытуемого образца хотя бы у одного животного, испытание должно быть повторено на удвоенном количестве животных того же вида. Повторное испытание считают удовлетворительным, если испытуемый образец отвечает вышеперечисленным требованиям.

Испытуемый образец признается прошедшим испытание, если ни одно животное из второй группы не погибнет или не проявятся признаки интоксикации и не будет отмечено уменьшение массы тела за период наблюдения.

Если оба животных погибнут, лекарственное средство признается не выдержавшим испытание.

Если в течение периода наблюдения регистрируют гибель одного животного, заболевание, уменьшение массы, развитие некроза или абсцесса в месте введения испытуемого препарата хотя бы у одного животного, испытание должно быть повторено на удвоенном количестве животных того же вида. Повторное испытание считают удовлетворительным, если препарат отвечает вышеперечисленным требованиям.

Лекарственное средство признается прошедшим испытание, если ни одно животное из второй группы не погибнет или не проявятся признаки интоксикации и не будет отмечено уменьшение массы тела за период наблюдения.

ПИРОГЕННОСТЬ ОФС.1.2.4.0005.15

Испытание на пирогенность инъекционных растворов и субстанций, из которых они производятся, основано на измерении температуры тела у кроликов до и после инъекции.

Содержание животных и подготовка их к проведению испытания

Каждого кролика содержат в отдельной клетке на полноценном пищевом рационе, ограждая от раздражающих воздействий (акустических, оптических и других). Перед испытанием проводят осмотр животных и отбирают здоровых кроликов одного пола, не альбиносов, с массой тела от 2,0 до 3,5 кг, которые не теряли в массе в течение предыдущей недели.

В помещениях, где находятся животные и проводятся испытания, поддерживают постоянную температуру воздуха 20 ± 3 ºС.

За 18 часов до испытания кроликов лишают корма без ограничения воды. Во время опыта животные не получают ни корма, ни воды. Кроликов, впервые предназначенных для опыта или не участвовавших в опыте более четырех недель, предварительно готовят к процедуре испытания, осуществляя все рабочие операции (осмотр, взвешивание, измерение температуры тела) за исключением инъекции.

Кролики, ранее бывшие в опыте, могут быть использованы повторно через трое суток, если введенное им лекарственное средство было апирогенным. При повышении температуры тела у животного на 0,6 ºС и более, кролик может быть использован для дальнейших опытов не ранее, чем через две недели.

Если испытуемое лекарственное средство обладает антигенными свойствами, то порядок повторного использования животных для испытаний указывают в нормативной документанции.

Материалы и оборудование

Посуда для разведения, шприцы и иглы для инъекций должны быть стерильными и апирогенными, что обеспечивается нагреванием при температуре 250 ºС в течение 30 минут или 200 ºС в течение 60 минут.

Для разведения испытуемых лекарственных средств используют раствор натрия хлорида 0,9 % для инъекций, если в частной фармакопейной статье не указан другой растворитель. Все растворители должны быть стерильными и апирогенными.

Ректальную температуру у кроликов измеряют с точностью до 0,1 ºС медицинским максимальным ртутным или электронным термометром с термочувствительным датчиком. Термометр или датчик вводят в прямую кишку кролика на глубину от 5 до 7,5 см в зависимости от массы тела животного.

Введение испытуемого лекарственного средства

Испытуемое лекарственное средство вводят в ушную вену кролика, если в частной фармакопейной статье не указан другой путь введения. Объем инъецируемого раствора должен составлять не менее 0,2 мл и не более 10 мл на 1,0 кг массы тела животного. Перед введением раствор подогревают до 37,0 ± 2 ºС. Весь объем лекарственного средства вводят за период времени не более 2 минут.

Тест-дозу испытуемого лекарственного средства, объём вводимого раствора и, если необходимо, скорость введения указывают в частной фармакопейной статье.

Проведение испытания

Испытание лекарственного средства проводят на группе из трех кроликов с исходной температурой 38,5 ºС — 39,5 ºС.

Перед опытом, с интервалом не менее 30 минут, у каждого кролика дважды измеряют температуру тела. Различия в показаниях температуры у одного и того же животного не должны превышать 0,2 ºС. В противном случае кролика исключают из испытания. За исходную температуру принимают величину последнего результата измерения.

Раствор испытуемого лекарственного средства вводят животным сразу после второго измерения температуры.

Измерения температуры после внутривенного введения испытуемого лекарственного средства проводят с интервалом не более 30 минут на протяжении трех часов. При других путях парентерального введения – на протяжении пяти часов.

Учет результатов

Испытание лекарственного средства можно проводить поэтапно. На каждом этапе используют трех кроликов. Максимальное число этапов не должно превышать четырех.

По окончании каждого из этапов испытания определяют максимальное изменение температуры (Δt) тела у кролика по сравнению с исходным значением.

Изменение температуры тела животного ниже исходной величины принимают за нуль и не учитывают.

Для трех кроликов определяют сумму индивидуальных максимальных повышений температур ($\Sigma \Delta t$). Значения $\Sigma \Delta t$, полученные на разных этапах испытания, последовательно суммируют, а результаты сравнивают с уровнями, указанными в табл. 26.1.

- **После первого этапа испытания лекарственное средство признают апирогенным**, если полученный результат меньше или равен 1,2 ºС (колонка 3), а индивидуальное повышение температуры ни у одного из кроликов не превышает 0,5 ºС (колонка 4).
- Если результат, полученный на первом этапе, превышает 1,2 ºС (колонка 5) или зарегистрировано индивидуальное повышение температуры более 0,5 ºС, хотя бы у одного из трех кроликов (колонка 6), то необходимо перейти к проведению следующего этапа испытания.
- **После второго этапа испытания лекарственное средство признают апирогенным**, если полученный результат меньше или равен 2,8 ºС (колонка 3), а индивидуальное повышение температуры свыше 0,5 ºС отмечено не более, чем у одного из шести кроликов (колонка 4).
- Если результат, полученный на втором этапе испытания, больше 2,8 ºС, но меньше 4,3 ºС (колонка 5), или зарегистрировано индивидуальное повышение температуры свыше 0,5 ºС более, чем у одного животного (колонка 6), то необходимо перейти к проведению следующего этапа испытания.
- **После третьего этапа испытания лекарственное средство признают апирогенным**, если полученный результат меньше или равен 4,5 ºС (колонка 3), а индивидуальное повышение температуры свыше 0,5 ºС отмечено не более, чем у двух из девяти кроликов (колонка 4).
- Если результат, полученный на третьем этапе испытания, больше 4,5 ºС, но меньше 6,0 ºС (колонка 5), или зарегистрировано индивидуальное повышение температуры свыше 0,5 ºС более, чем у двух животных (колонка 6), то необходимо перейти к проведению следующего этапа испытания.
- **После четвертого этапа испытания лекарственное средство признают апирогенным**, если полученный результат меньше или равен 6,6 ºС

(колонка 3), а индивидуальное повышение температуры свыше 0,5 ºС отмечено не более, чем у трех из двенадцати кроликов (колонка 4).

- **Лекарственное средство признают пирогенным**, если результат на втором или последующих этапах испытания выше, чем величины, указанные в колонке 7.
- **Лекарственное средство признают пирогенным** и в том случае, если в результате четырех этапов испытания зарегистрировано индивидуальное повышение температуры свыше 0,5 ºС более, чем у трех кроликов из двенадцати.

Таблица 26.1

Этап	Общее количество животных	**Оценка результатов испытания (ΣΔt)**				
		Лекарственное средство признают апирогенным		Повторное испытание (перестановку) проводят		Лекарственное средство признают пирогенным, если ΣΔt
		если Σ Δt	при числе животных с повышением Δt > 0,5 °С не более	если ΣΔt	при числе животных с повышением Δt > 0,5 °С	
1	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*7*
I	**3**	**≤ 1,2**	**—**	**> 1,2**	**≥ 1**	**—**
II	**6**	**≤ 2,8**	**1**	**> 2,8, но < 4,3**	**> 1**	**> 4,3**
III	**9**	**≤ 4,5**	**2**	**> 4,5, но < 6,0**	**> 2**	**> 6,0**
IV	**12**	**≤ 6,6**	**3**	**—**	**—**	**> 6,6***

***** *При индивидуальном повышении температуры свыше 0,5 °С более, чем у трех кроликов из двенадцати, лекарственное средство признают пирогенным*

Бактериальные эндотоксины **ОФС.1.2.4.0006.15**

Настоящая статья описывает методы определения бактериальных эндотоксинов в лекарственных препаратах, предназначенных для парентерального применения и фармацевтических субстанциях, используемых для их изготовления.

Определение содержания бактериальных эндотоксинов проводят с помощью реактива, представляющего собой лизат амебоцитов из крови мечехвоста *(Limulus polyphemus* или *Tachypleus tridentatus)*. Лизат амебоцитов специфически реагирует с бактериальными эндотоксинами. В результате ферментативной реакции происходит изменение реакционной смеси, пропорциональное концентрации эндотоксина.

Существуют три основных методологических подхода для проведения данного испытания: гель-тромб метод, основанный на образовании геля; турбидиметрический метод, основанный на помутнении реакционной смеси после расщепления субстрата, содержащегося в лизате амебоцитов; и хромогенный метод, основанный на появлении окрашивания после расщепления синтетического пептид-хромогенного комплекса.

В данной статье описаны следующие шесть тестов, основанных на описанных выше принципах:

– Качественный гель-тромб тест (Метод А);

– Количественный гель-тромб тест (Метод В);

– Турбидиметрический кинетический тест (Метод C);

– Хромогенный кинетический тест (Метод D);

– Хромогенный тест по конечной точке (Метод E);

– Турбидиметрический тест по конечной точке (Метод F).

Испытание проводят любым из шести приведенных методов. В случае сомнений или разногласий окончательное заключение принимают на основании результатов, полученных при проведении испытания методом А.

Посуда и ее подготовка

Стеклянная и пластиковая посуда, используемая в тесте, не должна содержать бактериальные эндотоксины в количествах, определяемых в тесте, и не должна оказывать влияния на ход реакции.

Рекомендуемым режимом депирогенизации является нагревание при температуре 250 °С не менее 30 минут в соответствии с валидированной процедурой.

Стандарты эндотоксина

Содержание бактериальных эндотоксинов выражается в единицах эндотоксина (ЕЭ) Международного стандарта эндотоксина. Одна международная единица (МЕ) эндотоксина соответствует одной ЕЭ.

При проведении анализа может использоваться Контрольный стандарт эндотоксина (КСЭ), активность которого установлена по Международному стандарту эндотоксина. КСЭ должен быть предназначен для проведения анализа с данной партией лизата амебоцитов. Растворение и хранение КСЭ осуществляют согласно инструкции фирмы-производителя.

Лизат амебоцитов

Необходимо использовать лизат амебоцитов из крови мечехвоста *(Limulus polyphemus* или *Tachypleus tridentatus)*, предназначенный для выбранного метода определения бактериальных эндотоксинов.

Чувствительность лизата амебоцитов (λ) выражена в единицах эндотоксина [ЕЭ/мл] и соответствует минимальной концентрации Международного стандарта эндотоксина, которая вызывает образование

плотного геля при реакции с данным лизатом амебоцитов (Методы A и B), или соответствует точке с минимальным значением на стандартной кривой (Методы C, D, E и F).

Разведение лиофилизированного лизата амебоцитов и его хранение осуществляют согласно инструкции фирмы-производителя.

Примечание

Лизат амебоцитов, кроме эндотоксинов, может реагировать и с некоторыми β-глюканами, поэтому возможно использование специфического лизата амебоцитов, у которого удален фактор G, реагирующий с глюканами. Также разрешается применение вспомогательных растворов, которые блокируют реакционную систему фактора G. Такие реактивы могут применяться для определения эндотоксинов в присутствии глюканов.

Вода для теста бактериальные эндотоксины (БЭТ)

Для приготовления растворов реактивов и разведений испытуемого лекарственного средства используют воду для БЭТ. Вода для БЭТ должна соответствовать требованиям, предъявляемым к воде для инъекций, и при этом не должна содержать бактериальные эндотоксины в количествах, определяемых в тесте.

Подготовка испытуемого образца

Каждый отобранный образец испытывается индивидуально.

Для растворения и/или разведения испытуемого лекарственного средства используют воду для БЭТ, если в частной статье не указан иной растворитель. Испытуемый раствор должен иметь pH в пределах, указанных производителем лизата амебоцитов, обычно 6,0 – 8,0. В случае необходимости pH доводят до нужного значения растворами кислоты, основания или с помощью буферного раствора. Используемые растворы не должны содержать бактериальные эндотоксины в количествах, определяемых в тесте, и не должны оказывать влияния на ход реакции.

Максимально допустимое разведение испытуемого лекарственного средства

Максимально допустимое разведение (МДР) представляет собой наибольшее разведение испытуемого лекарственного средства, в котором

возможно определение концентрации эндотоксина, соответствующей значению предельного содержания бактериальных эндотоксинов, установленному для данного лекарственного средства.

Испытуемое лекарственное средство может быть проверено в одном разведении или в серии разведений при условии, что конечная степень разведения не превысит значения МДР, которое рассчитывается по формуле:

$$МДР = \frac{\text{Предельное содержание бактериальных эндотоксинов} \cdot \text{Концентрация испытуемого раствора}}{\lambda}$$

где: «*предельное содержание бактериальных эндотоксинов»* – допустимое содержание бактериальных эндотоксинов в испытуемом лекарственном средстве, указанное в частной статье;

«концентрация испытуемого раствора» – концентрация лекарственного средства или действующего вещества, для которого указано предельное содержание бактериальных эндотоксинов;

λ — чувствительность лизата амебоцитов, в ЕЭ/мл.

Для расчета предельного содержания бактериальных эндотоксинов используют следующую формулу:

$$Предельное\ содержание\ бактериальных\ эндотоксинов = \frac{K}{M},$$

где: К – пороговая пирогенная доза, равная 5 ЕЭ/кг в 1 час для испытуемого лекарственного препарата (если он вводится пациенту любым парентеральным путем, кроме интратекального). При интратекальном пути введения лекарственного препарата К составляет 0,2 ЕЭ/кг;

М – максимальная терапевтическая доза испытуемого лекарственного средства, вводимая в течение одного часа (выражается в мг, мл или ЕД на 1 кг массы тела).

Для радиофармацевтических лекарственных препаратов, вводимых внутривенно, предельное содержание бактериальных эндотоксинов рассчитывают как 175/V, где V – максимальная рекомендованная доза в мл. Для радиофармацевтических лекарственных препаратов, вводимых

интратекально, предельное содержание бактериальных эндотоксинов равняется 14/V.

Для лекарственных препаратов, доза которых рассчитывается на $м^2$ поверхности тела (например, противоопухолевые препараты), пороговая пирогенная доза (К) составляет 100 ЕЭ/$м^2$.

Гель-тромб тест (Методы А и В)

Гель-тромб метод позволяет установить наличие или измерить количественно концентрацию эндотоксинов в пробе. В результате реакции лизата амебоцитов с эндотоксином увеличивается вязкость реакционной смеси вплоть до формирования плотного геля.

Для обеспечения точности и достоверности испытаний заявленную чувствительность лизата амебоцитов следует подтвердить, а также провести испытание на наличие мешающих факторов, как описано в разделе *«Предварительные анализы».*

Процедура испытания. В круглодонные стеклянные пробирки (из боросиликатного стекла) диаметром 10 мм вносят равные объемы испытуемого раствора и лизата амебоцитов (по 0,1 мл). Реакционные смеси аккуратно перемешивают и инкубируют при температуре 37 ± 1 °С в течение 60 ± 2 минут. Во время инкубирования следует избегать вибрации и ударов. По истечении указанного срока визуально регистрируют результаты как положительные или отрицательные. Положительная реакция (+) характеризуется образованием плотного геля, который не разрушается при аккуратном однократном переворачивании пробирки на 180°. Отрицательная реакция (–) характеризуется отсутствием такого геля.

ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ АНАЛИЗЫ

Подтверждение заявленной чувствительности лизата амебоцитов

Анализ проводят для каждой новой серии используемого лизата амебоцитов, а также при изменении условий эксперимента, используемых материалов и реактивов, способных повлиять на результаты теста.

Процедура испытания. Для проведения анализа готовят растворы C и D по схеме, приведенной в Таблице 1.

Таблица 1 - **Схема эксперимента «Подтверждение заявленной чувствительности лизата амебоцитов»**

Раствор	Исходный раствор	Растворитель	Фактор разведения	Конечная концентрация КСЭ в испытуемом растворе	Количество повторностей
C	Раствор КСЭ в воде для БЭТ с концентрацией 2λ	Вода для БЭТ	1 2 4 8	2λ 1λ 0,5λ 0,25λ	4 4 4 4
D	Вода для БЭТ	—	—	—	2

Растворы C – серия разведений КСЭ в воде для теста (проверка чувствительности лизата амебоцитов);

Раствор D – вода для БЭТ (отрицательный контроль).

Результаты и интерпретация. Анализ считают достоверным, если:

– для *раствора D* (отрицательный контроль) во всех повторностях получены отрицательные результаты;

– для *раствора C* с концентрацией 2λ, получены положительные результаты;

– для *раствора C* с концентрацией 0,25λ, получены отрицательные результаты.

Конечной точкой реакции для каждой из повторностей *раствора C* является положительный результат, полученный для раствора с наименьшей концентрацией КСЭ. По этим результатам рассчитывается среднее геометрическое значение чувствительности лизата амебоцитов по следующей формуле:

$$\text{Среднее геометрическое значение концентраций КСЭ в конечной точке реакции} = antilog\left(\frac{\sum e}{f}\right),$$

где: $\sum$ e – сумма логарифмов концентраций КСЭ в конечной точке реакции в каждой из повторностей;

f – число повторностей.

Заявленная чувствительность лизата амебоцитов считается подтвержденной и используется в дальнейших расчетах в том случае, если полученное в эксперименте значение чувствительности лизата амебоцитов, не менее 0,5λ и не более 2λ.

Мешающие факторы

Испытуемое лекарственное средство может содержать мешающие факторы, усиливающие и/или ингибирующие реакцию лизата амебоцитов с бактериальными эндотоксинами. Обнаружить эти явления можно, сравнив способность используемого лизата амебоцитов реагировать с раствором КСЭ в воде для БЭТ и в растворе испытуемого лекарственного средства в стандартных условиях проведения эксперимента.

Испытанию может быть подвергнуто лекарственное средство в любом разведении, не превышающем значения МДР. Используемые в данном анализе пробы испытуемого лекарственного средства (или его разведения) не должны содержать бактериальных эндотоксинов в определяемых в тесте количествах.

Процедура испытания. Для проведения анализа готовят растворы A – D по схеме, приведенной в Таблице 2.

Раствор A – испытуемое лекарственное средство в выбранном разведении (контроль отсутствия бактериальных эндотоксинов);

Растворы B – серия разведений КСЭ в растворе испытуемого лекарственного средства (выявление возможности ингибирования или усиления реакции);

Растворы C – серия разведений КСЭ в воде для БЭТ (положительный контроль);

Раствор D – вода для БЭТ (отрицательный контроль).

Таблица 2 - Схема эксперимента «Мешающие факторы»

Раствор	**Исходный раствор**	**Растворитель**	**Фактор разведения**	**Конечная концентрация эндотоксина в испытуемом растворе**	**Количество повторностей**
A	Испытуемое лекарственное средство	–	–	–	4
B	Испытуемое лекарственное средство, содержащее КСЭ в концентрации 2λ	Испытуемое лекарственное средство	1 2 4 8	2λ 1λ 0,5λ 0,25λ	4 4 4 4
C	Раствор КСЭ в воде для БЭТ с концентрацией 2λ	Вода для БЭТ	1 2 4 8	2λ 1λ 0,5λ 0,25λ	2 2 2 2
D	Вода для БЭТ	–	–	–	2

Результаты и интерпретация. Результаты эксперимента считаются достоверными, если:

– для *растворов A* и *D* получены отрицательные результаты во всех повторностях;

– для *растворов C* (положительный контроль) среднее геометрическое значение концентрации бактериальных эндотоксинов составляет не менее 0,5λ и не более 2λ.

По результатам, полученным для каждой из повторностей *растворов B*, рассчитывают среднее геометрическое значение чувствительности лизата амебоцитов. Расчет проводят, как описано в разделе «*Подтверждение заявленной чувствительности лизата амебоцитов»*. Если полученное среднее значение оказалось не менее 0,5λ и не более 2λ, считают доказанным, что испытуемое лекарственное средство в выбранном разведении не содержит мешающих факторов, способных ингибировать и/или усиливать реакцию лизата амебоцитов с бактериальными

эндотоксинами и оно может быть подвергнуто анализу на содержание бактериальных эндотоксинов.

Если обнаружено присутствие мешающих факторов для испытуемого лекарственного средства, которое проверялось в разведении, меньшем МДР, анализ повторяют в большем разведении, вплоть до разведения, равного МДР. В большинстве случаев дополнительное разведение испытуемого лекарственного средства способно устранить действие мешающих факторов. Использование лизата амебоцитов большей чувствительности позволяет увеличить степень разведения.

Действие мешающих факторов может быть преодолено соответствующей подготовкой образца, например, фильтрацией, диализом или температурной обработкой, нейтрализацией путем добавления специфичного продукта. Выбранный способ удаления мешающих факторов не должен изменять концентрацию бактериальных эндотоксинов в испытуемом лекарственном средстве, поэтому к раствору испытуемого лекарственного средства КСЭ известной концентрации добавляют перед проведением такой обработки, после чего проводят анализ «*Мешающие факторы*». Если после обработки выбранным способом результаты анализа окажутся удовлетворительными, то испытуемое лекарственное средство может быть подвергнуто анализу на содержание бактериальных эндотоксинов.

Если испытуемое лекарственное средство нельзя освободить от мешающих факторов, оно не может быть исследовано на предмет содержания бактериальных эндотоксинов с помощью данных методов.

КАЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ (Метод А)

Задачей этого анализа является подтверждение того, что содержание бактериальных эндотоксинов в испытуемом образце не превышает значения предельного содержания бактериальных эндотоксинов, указанного в частной статье.

Процедура испытания. Для проведения анализа готовят *Растворы A – D* по схеме, приведенной в Таблице 3.

Раствор A – испытуемое лекарственное средство в разведении, в котором отсутствуют мешающие факторы, или в большем разведении, не превышающем МДР;

Раствор B – испытуемое лекарственное средство в выбранном разведении, к которому добавлен КСЭ. Конечная концентрация эндотоксина в анализируемом растворе должна составлять 2λ (положительный контроль испытуемого образца).

Раствор C – раствор КСЭ в воде для БЭТ с конечной концентрацией 2λ (положительный контроль).

Раствор D – вода для БЭТ (отрицательный контроль).

Таблица 3 - **Схема эксперимента «Качественный анализ»**

Раствор	**Исходный раствор**	**Конечная концентрация эндотоксина (*КСЭ*) в испытуемом растворе**	**Количество повторностей**
A	Испытуемое лекарственное средство	–	2
B	Испытуемое лекарственное средство, содержащее КСЭ в концентрации 2λ	2λ	2
C	Раствор КСЭ в воде для БЭТ с концентрацией 2λ	2λ	2
D	Вода для БЭТ	–	2

Результаты и интерпретация. Анализ считают достоверным, если:

– для *раствора D* (отрицательный контроль) получены отрицательные результаты в обеих повторностях,

– для *раствора C* (положительный контроль) во всех повторностях получены положительные результаты,

– для *раствора B* (положительный контроль испытуемого образца) в обеих повторностях получены положительные результаты.

Если для *раствора A* в двух повторностях получены отрицательные результаты, лекарственное средство считают выдержавшим испытания.

Если для испытуемого лекарственного средства в разведении, меньшем МДР, в двух повторностях получены положительные результаты, анализ следует повторить в большем разведении или в разведении, равном МДР.

Если для испытуемого лекарственного средства в разведении, равном МДР, в двух повторностях получены положительные результаты, то лекарственное средство не соответствует требованиям раздела «Бактериальные эндотоксины» частной статьи.

Если положительный результат получен в одной из повторностей для *раствора A*, то проводят повторный анализ. Лекарственное средство считается выдержавшим испытания, если в повторном анализе для двух повторностей получены отрицательные результаты.

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ (Метод В)

Этим методом определяют содержание бактериальных эндотоксинов с помощью ряда последовательных разведений испытуемого лекарственного средства.

Процедура испытания. Для проведения анализа готовят *Растворы A – D* по схеме, приведенной в Таблице 4.

Растворы A – разведения испытуемого лекарственного средства, начиная с того разведения, в котором отсутствуют мешающие факторы, до наибольшего разведения, не превышающего МДР.

Раствор B – наименьшее разведение из серии разведений раствора А, к которому добавлен раствор КСЭ. Конечная концентрация эндотоксина в анализируемом растворе должна составлять 2λ (положительный контроль испытуемого образца).

Растворы C – серия разведений КСЭ в воде для БЭТ (положительный контроль).

Раствор D – вода для БЭТ (отрицательный контроль).

Таблица 4 **- Схема эксперимента «Количественный анализ»**

Раствор	**Исходный раствор**	**Растворитель**	**Фактор разведения**	**Конечная концентрация *КСЭ* в испытуемом растворе**	**Количество повторностей**
A	Испытуемое лекарственное средство	Вода для БЭТ	1 2 4 8 и т.д. до МДР	– – – –	2 2 2 2
B	Испытуемое лекарственное средство, содержащее КСЭ в концентрации 2λ	Испытуемое лекарственное средство	1	2λ	2
C	Раствор КСЭ в воде для БЭТ с концентрацией 2λ	Вода для БЭТ	1 2 4 8	2λ 1λ 0,5λ 0,25λ	2 2 2 2
D	Вода для БЭТ	–	–	–	2

Результаты и интерпретация. Анализ считают достоверным, если:

– для *раствора D* (отрицательный контроль) получены отрицательные результаты в двух повторностях,

– для *растворов C* (положительный контроль) среднее геометрическое значение концентрации бактериальных эндотоксинов составляет не менее 0,5λ и не более 2λ.

– для *раствора B* (положительный контроль испытуемого образца) получены положительные результаты в двух повторностях,

Для *растворов A* конечной точкой реакции является положительный результат, полученный для наибольшего разведения испытуемого лекарственного средства.

Значение произведения фактора этого разведения на величину чувствительности лизата амебоцитов (λ) равно концентрации эндотоксина в *растворе A*, полученной для данной повторности. Среднее геометрическое

значение концентрации эндотоксина рассчитывают, как описано в разделе «*Подтверждение заявленной чувствительности лизата амебоцитов*».

Если во всех повторностях серии *растворов А* получены отрицательные результаты, то концентрация бактериальных эндотоксинов в испытуемом лекарственном средстве меньше величины произведения чувствительности лизата амебоцитов и наименьшего фактора разведения. Если во всех повторностях серии *растворов А* получены положительные результаты, то концентрация бактериальных эндотоксинов в испытуемом лекарственном средстве больше величины произведения чувствительности лизата амебоцитов и наибольшего фактора разведения.

Лекарственное средство считают выдержавшим испытание, если определенное в эксперименте среднее значение содержания бактериальных эндотоксинов менее значения предельного содержания бактериальных эндотоксинов, указанного в частной статье.

ФОТОМЕТРИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ (Методы C, D, E и F)

ТУРБИДИМЕТРИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ (C и F)

Турбидиметрические методы относятся к фотометрическим методам, основанным на измерении степени мутности реакционной смеси. В зависимости от принципа, положенного в основу проведения испытания, указанный метод может быть проведен как турбидиметрический тест по конечной точке, либо как турбидиметрический кинетический анализ.

Турбидиметрический тест по конечной точке (Метод F) основан на измерении степени мутности реакционной смеси в конце инкубационного периода, которая зависит от концентрации эндотоксина.

Турбидиметрический кинетический тест (Метод C) основан на определении скорости развития мутности реакционной смеси, измеряемой по времени, необходимому для достижения заданной величины оптической плотности.

Испытание проводят при температуре инкубирования, рекомендованной производителем лизата амебоцитов (обычно 37 ± 1°C).

ХРОМОГЕННЫЕ МЕТОДЫ (D и E)

Хромогенные методы используют для измерения количества хромофора, высвободившегося из хромогенного субстрата в результате реакции эндотоксинов с лизатом амебоцитов. В зависимости от принципа, положенного в основу испытания, этот метод может быть проведен как хромогенный тест по конечной точке или как хромогенный кинетический анализ.

Хромогенный тест по конечной точке (Метод E) основан на измерении интенсивности окраски реакционной смеси, зависящей от количества хромофора, высвободившегося в конце инкубационного периода. Количество, выделившегося хромофора, зависит от концентрации эндотоксина.

В процессе испытания хромогенным кинетическим методом (метод D) определяют скорость развития окраски реакционной смеси, измеряемой по времени, необходимому для достижения заданной величины оптической плотности реакционной смеси.

Испытание проводят при температуре инкубирования, рекомендованной производителем лизата амебоцитов (обычно 37 ± 1°C).

ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ АНАЛИЗЫ

Для подтверждения достоверности и точности испытания турбидиметрическим или хромогенным методом проводят предварительные анализы, позволяющие убедиться в достоверности критериев для стандартной кривой и в том, что испытуемый раствор не содержит факторов, мешающих проведению реакции.

При внесении любых изменений, способных повлиять на результаты эксперимента, требуется дополнительное подтверждение достоверности и точности испытания.

Проверка достоверности критериев стандартной кривой

Анализ проводят для каждой новой серии лизата амебоцитов.

Для построения стандартной кривой из исходного раствора КСЭ готовят не менее трех различных концентраций эндотоксина в соответствии с рекомендациями производителя лизата амебоцитов. Анализ проводят, как минимум, в трех повторностях в условиях, предусмотренных производителем лизата амебоцитов (объемные соотношения, время инкубирования, температура, pH и т.д.).

Если в кинетических методах необходимо построить стандартную кривую с диапазоном КСЭ, превышающим 2 lg величины концентрации эндотоксина для каждого изменения диапазона измерения на lg величины концентраций эндотоксина, в схему опыта необходимо включить раствор КСЭ соответствующей концентрации.

Для проверяемого диапазона концентраций эндотоксина абсолютное значение коэффициента корреляции |r| должно быть равно или более 0,980.

Мешающие факторы

Испытанию может быть подвергнуто лекарственное средство в любом разведении, не превышающем значения МДР.

Процедура испытания. Готовят растворы A – D, как указано в Таблице 5. Испытание растворов A, B, C и D проводят по меньшей мере в двух повторностях, в соответствии с рекомендациями производителя лизата амебоцитов (объемы и объемные соотношения испытуемого препарата и лизата амебоцитов, время инкубирования, температура, pH и т.д.).

Таблица 5 - **Схема эксперимента «Мешающие факторы»**

Раствор	**Концентрация эндотоксина**	**Раствор, к которому добавлен эндотоксин**	**Количество повторностей**
A	–	Испытуемый раствор	Не менее 2
B	Средняя концентрация стандартной кривой	Испытуемый раствор	Не менее 2
C	Не менее 3-х концентраций (наименьшая концентрация обозначается λ)	Вода для БЭТ	Не менее 2 для каждой из концентраций
D	–	Вода для БЭТ	Не менее 2

Раствор А — раствор испытуемого лекарственного средства в разведении, не превышающем значение МДР;

Раствор В — испытуемое лекарственное средство в выбранном разведении, к которому добавлен КСЭ. Конечная концентрация эндотоксина в анализируемом растворе должна соответствовать или быть близкой среднему значению концентраций КСЭ, использованных для построения стандартной кривой (положительный контроль испытуемого образца);

Растворы С — растворы КСЭ, используемые для построения стандартной кривой в тех же концентрациях, которые использовались при проведении анализа «Проверка достоверности критериев стандартной кривой» (положительный контроль);

Раствор D — вода для для БЭТ (отрицательный контроль).

Испытание считают достоверным, если соблюдены следующие условия:

– результаты, полученные для стандартной кривой (Раствор С) соответствуют требованиям достоверности, установленным в разделе «Проверка достоверности критериев для стандартной кривой»;

– результат, полученный для раствора D (отрицательный контроль) не превышает значения величины, указанной в инструкции к используемому лизату амебоцитов или менее концентрации эндотоксина, определяемой используемым методом.

Полученное в опыте среднее значение концентрации добавленного эндотоксина рассчитывают, вычитая из среднего значения концентрации эндотоксина в *растворе В* (содержащего добавленный эндотоксин) среднее значение концентрации эндотоксина в *растворе А* (при его наличии).

Считают доказанным, что испытуемый раствор не содержит мешающих факторов, если в условиях испытания измеренная концентрация эндотоксина, добавленного в испытуемый раствор, составляет 50–200% от известной концентрации добавленного эндотоксина.

Если определенная в опыте концентрация эндотоксина не укладывается в заданный диапазон, делают заключение, что испытуемый препарат содержит факторы, мешающие реакции. В этом случае опыт может быть повторен в большем разведении, вплоть до разведения, равного МДР. Помимо большего разведения испытуемого препарата, влияние мешающих факторов может быть преодолено соответствующей подготовкой образца, например, фильтрацией, диализом или температурной обработкой, нейтрализацией путем добавления специфичного продукта.

Выбранный способ удаления мешающих факторов не должен приводить к уменьшению концентрации бактериальных эндотоксинов в испытуемом лекарственном средстве, поэтому перед проведением такой обработки к испытуемому раствору следует сначала добавить раствор КСЭ известной концентрации, после чего повторить анализ «Мешающие факторы». Если после обработки выбранным способом результаты анализа окажутся удовлетворительными, то испытуемое лекарственное средство может быть подвергнуто анализу на содержание бактериальных эндотоксинов.

Если испытуемое лекарственное средство нельзя освободить от мешающих факторов, оно не может быть исследовано на предмет содержания бактериальных эндотоксинов с помощью данных методов.

Проведение испытания

Процедура испытания. Испытание проводят в соответствии с методикой, приведенной в разделе «Мешающие факторы».

Результаты. Для *раствора А* в каждой повторности определяют концентрацию эндотоксинов, используя стандартную кривую, полученную на основании серий разведений КСЭ (*Раствор С*).

Испытание считают достоверным, если соблюдены следующие условия:

1. результаты, полученные для стандартной кривой (*Растворы C*), соответствуют требованиям достоверности, установленным в разделе «*Проверка достоверности критериев для стандартной кривой*»;
2. определенная в опыте концентрация эндотоксина, добавленного к *раствору B* после вычитания значения концентрации эндотоксина, определённого в *растворе A*, находится в пределах от 50 до 200% от известной величины;
3. результат, полученный для *раствора D* (отрицательный контроль), не превышает значения величины, указанной в сертификате к используемому лизату амебоцитов или менее концентрации эндотоксина, определяемой используемым методом.

Интерпретация результатов. Лекарственное средство считают выдержавшим испытание, если определенное в эксперименте среднее значение содержания бактериальных эндотоксинов в повторностях *раствора A* (с учетом разведения и концентрации испытуемого лекарственного средства) менее значения предельного содержания бактериальных эндотоксинов, указанного в частной статье.

Испытание на гистамин **ОФС.1.2.4.0007.15**

Настоящая статья распространяется на определение содержания гистамина *in vitro* в лекарственных средствах для парентерального применения.

Подготовка изолированного органа

В опыт берут морскую свинку-самца массой тела 200–350 г. За 24 ч до эксперимента животное лишают пищи, но оставляют свободный доступ к воде. После эвтаназии у свинки вскрывают брюшную полость от лонного сочленения до грудины и находят слепую кишку. Место её перехода в ободочную кишку является ориентиром при поиске подвздошной кишки, которая отходит от слепой за 1–2 см до этого участка.

Для того чтобы извлечь подвздошную кишку, тупым зажимом или пинцетом плотно захватывают её основание и отрезают ножницами. Отсечённый конец кишки слегка приподнимают, а затем без натяжения и, не перехватывая её, отсекают ткань брыжейки маленькими разрезами при помощи тупоконечных ножниц. Остатки брыжейки удалять не следует. Все манипуляции с подвздошной кишкой следует проводить осторожно, не растягивая её. Для эксперимента пригоден дистальный участок подвздошной кишки, исключая 10–15 см, ближайшие к слепой кишке.

Подвздошную кишку нарезают на равные части (около 6 см каждая) и помещают в чашку Петри с *гипокальциевым раствором Тироде* (примечание

1). Этим раствором осторожно промывают полученные отрезки с помощью шприца или резиновой груши с пастеровской пипеткой с затуплённым концом до полного удаления содержимого кишечника. Промытые отрезки подвздошной кишки помещают в чистый *гипокальциевый раствор Тироде*. Они могут быть использованы сразу или храниться в течение 24 ч при температуре от 2 °С до 4 °С (примечание 2).

Непосредственно перед экспериментом промытый отрезок кишки разрезают до длины, требуемой условиями эксперимента (10 мм при использовании электронного датчика или 20 мм при использовании механического рычага и кимографа).

Приготовление растворов сравнения и разведений испытуемого образца

1. Растворы сравнения

В качестве *растворов сравнения* используют растворы гистамина дигидрохлорида ч. или ч.д.а. в трёх концентрациях: *раствор 1* ($1{,}30 \cdot 10^{-6}$ г/мл); *раствор 2* ($2{,}5 \cdot 10^{-6}$ г/мл) и *раствор 3* ($5{,}00 \cdot 10^{-6}$ г/мл), вызывающие 50, 75 и 100 % сокращение кишки соответственно. В качестве растворителя используют 0,9 % раствор натрия хлорида. Объём введения *растворов сравнения* составляет 1/100 от объёма ванночки.

2. Разведение испытуемого образца

Испытанию подвергают неразведённый испытуемый образец, когда максимально допустимая нормативной документацией концентрация гистамина в неразведённом препарате находится в диапазоне от $1{,}30 \cdot 10^{-6}$ г/мл до $2{,}50 \cdot 10^{-6}$ г/мл в пересчёте на гистамина дигидрохлорид. Объём введения испытуемого образца должен составлять 1/100 от объёма ванночки.

Если значение максимально допустимой концентрации гистамина в пересчёте на гистамина дигидрохлорид в неразведённом испытуемом образце, меньше указанного диапазона или близко к его нижнему пределу, допустимо увеличение объёма введения неразведённого испытуемого образца до 1/20 от объёма ванночки.

Если максимально допустимая концентрация гистамина в пересчёте на гистамина дигидрохлорид в неразведённом испытуемом образце находится выше указанного диапазона, испытуемый образец разводят 0,9 % раствором натрия хлорида до предполагаемой концентрации гистамина дигидрохлорида $2{,}50 \cdot \times 10^{-6}$ г/мл (объём введения 1/100 от объёма ванночки).

Регистрирующая система

Для регистрации сокращений изолированного отрезка подвздошной кишки морской свинки в изотонических условиях в ответ на введение *растворов сравнения* и испытуемого образца используют регистрирующую систему, состоящую из термостатируемой ванночки с *гипокальциевым раствором Тироде* при температуре 34–36 ºС, а также электронного датчика с регистрирующим устройством или механического рычага с кимографом. Ванночку аэрируют карбогеном (95 % O_2 и 5 % CO_2) или воздухом. Нагрузка обычно составляет 500–800 мг. В случае использования механического рычага для вычисления нагрузки следует применять правило равновесия:

сила × плечо силы = нагрузка × плечо нагрузки.

Проведение опыта

Изолированный отрезок подвздошной кишки помещают в ванночку и прикрепляют к регистрирующей системе с помощью лигатуры по диагонали за противоположные концы: один – к крючку на дне ванночки, а другой – к датчику или рычагу. Прикладывают к отрезку нагрузку и оставляют его в покое на 30 мин. За это время необходимо не менее 3 раз сменить в ванночке *гипокальциевый раствор Тироде*.

1. Адаптация изолированного отрезка подвздошной кишки морской свинки к субмаксимальной дозе гистамина

В термостатируемую ванночку вводят *раствор 3* в объёме, равном 1/100 от её ёмкости. Через 30 с (время экспозиции) ванночку промывают тройным объёмом *гипокальциевого раствора Тироде*. После первого отмывания проводят второе таким же объёмом раствора. Не менее чем через 4 мин после первого введения снова повторяют цикл «введение–экспозиция–два отмывания». Эти циклы повторяют до тех пор, пока не получат не менее двух одинаковых пиков. Их высоту принимают за 100 % (примечание 3). Временные интервалы между введениями испытуемого вещества и между двумя отмываниями должны быть постоянными.

2. Испытание испытуемого образца на гистамин

2.0. Предварительное испытание

После достижения постоянной величины ответа отрезка кишки на введение *раствора 3* проводят испытание испытуемого образца на гистамин. Для этого с интервалом не менее 4 мин однократно в случайном порядке вводят *растворы 1* и *3*, и неразведенный испытуемый образец. Циклы «введение–экспозиция–два отмывания» такие же, как и при проведении адаптации органа к субмаксимальной дозе.

В случае, если пик, полученный в ответ на введение испытуемого образца, по высоте не меньше, чем пик *раствора 1*, проводят количественное определение содержания гистамина в испытуемом образце (см.п.2.1). Если пик, полученный в ответ на введение испытуемого образца, меньше пика *раствора 1* или вообще отсутствует, проводят контрольное испытание (см.п.2.2).

2.1. Количественное испытание испытуемого образца на гистамин

В случайном порядке поочерёдно вводят *растворы 1* и *3* (1/100 от объёма ванночки), и разведённый или неразведённый испытуемый образец (тот же объём введения, что и при предварительном испытании) до получения не менее трёх пиков в ответ на введение каждого раствора. Находят среднее значение ответа отрезка кишки на каждый раствор. С помощью регрессионного анализа вычисляют параметры линейной зависимости среднего ответа кишки на введение *растворов сравнения* от логарифма их концентрации. Затем, подставляя полученные значения этих параметров в уравнение регрессии, вычисляют концентрацию гистамина в том разведении испытуемого образца, которому соответствует средняя высота его пика, и исходя из этого, рассчитывают содержание гистамина в неразведённом испытуемом образце.

Испытуемый образец считают прошедшим испытание, если найденное содержание гистамина не превышает максимально допустимое, указанное в нормативной документации (коэффициент пересчёта гистамина дигидрохлорида на гистамин-основание равен 0,6038).

2.2. Контрольное испытание

Схема проведения контрольного испытания такая же, как и при количественном определении содержания гистамина в испытуемом образце, только вместо испытуемого образца используют *раствор 2* (1/100 от объёма ванночки). Если средняя высота его пика соответствует вводимой концентрации гистамина дигидрохлорида в данном растворе ($2{,}50 \cdot 10^{-6}$ г/мл), то результаты опыта следует признать достоверными.

Результаты опыта следует признать недостоверными в каждом из следующих случаев:

1. Если средняя высота пика *раствора 2* не соответствует вводимой концентрации гистамина дигидрохлорида в данном растворе ($2{,}50 \cdot 10^{-6}$ г/мл).

2. Если при количественном определении содержания гистамина в испытуемом образце отсутствует воспроизводимость ответов отрезка кишки на введение испытуемого образца.

3. Если в процессе эксперимента наблюдается значительное снижение высоты пиков.

В каждом из этих 3 случаев следует провести испытание испытуемого образца на вещества депрессорного действия в соответствии с ОФС «Испытание на депрессорные вещества».

Примечания

1. Гипокальциевый раствор Тироде.

Состав:

• Натрия хлорид	80,00 г;
• Натрия гидрокарбонат	10,00 г;
• D-глюкоза	11,00 г;
• Калия хлорид	2,00 г;
• Кальция хлорид дигидрат	1,30 г;
• Магния хлорид гексагидрат	2,10 г;
• Натрия дигидрофосфат моногидрат	0,58 г;
• Вода очищенная	до 10 л.

Приготовление

В мерном цилиндре вместимостью 1 л растворяют в воде очищенной навески натрия хлорида, натрия гидрокарбоната и D-глюкозы в любом порядке. Доводят объём раствора тем же растворителем до метки, перемешивают и переливают содержимое цилиндра в 10-литровую стеклянную емкость с притёртой пробкой или полиэтиленовый сосуд того же объема с завинчивающейся крышкой.

Таким же образом, но по отдельности, каждую из оставшихся навесок растворяют в 1 л воды очищенной и по очереди переносят в тот же 10-литровый сосуд, строго придерживаясь следующего порядка:

1) калия хлорид,
2) кальция хлорид,
3) магния хлорид,
4) натрия дигидрофосфат.

Затем доливают воду очищенную до отметки 10 л и вновь тщательно перемешивают.

Полученный раствор может храниться при температуре от 3 ºС до 5 ºС не более 24 ч. Помутнение недопустимо.

Помутневший раствор следует вылить, тщательно промыть сосуд в проточной воде и прополоскать водой очищенной. Поверхностно активные моющие средства применять нельзя.

В качестве дополнительной меры по предупреждению спонтанной активности изолированного органа, в состав раствора можно добавить атропина сульфат в концентрации 0,5 мг/л или использовать растворы, указанные в Европейской фармакопее (2.6.10. HISTAMINE).

2. Сосуд, в котором находятся отрезки подвздошной кишки при хранении, плотно не закрывают, а затягивают двойным слоем марли, чтобы обеспечить доступ воздуха. Перед использованием в опыте отрезки следует подготовить. Для этого сосуд в течение 10 мин держат при комнатной температуре, а затем в течение 20 мин при температуре 34–36ºС в термостате. После нагревания из отрезка следует удалить слизь. Это достигается лёгкими поглаживающими движениями в продольном направлении.

3. Струя вводимого раствора должна быть направлена не прямо на изолированный отрезок кишки, а в сторону стенки ванночки, причём направление струи не должно меняться. Скорость введения должна быть максимально высокой и постоянной.

Регистрацию сокращений проводят непрерывно (скорость ленты 2 мм/мин.). В случае использования механического рычага и кимографа писчик во время отмывания можно отводить и прекращать запись.

Испытание на депрессорные вещества	**ОФС.1.2.4.0008.18** **Взамен ОФС.1.2.4.0008.15**

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на определение веществ депрессорного действия *in vivo* в инъекционных препаратах для внутрисосудистого введения и фармацевтических субстанциях, из которых их производят.

Испытание проводят на наркотизированных здоровых кошках любого пола массой не менее 2 кг. Самки не должны быть беременными или лактирующими. За 24 ч до испытания животное лишают корма, но оставляют свободный доступ к воде. Анестезию проводят с использованием любого средства для наркоза, позволяющего поддерживать стабильное артериальное давление, например хлоралозы и уретана или их смесь. У животного поддерживают температуру тела в физиологических пределах.

Кошку фиксируют в станке в положении лежа на спине. Отпрепаровывают сонную артерию, в которую вставляют канюлю, заполненную раствором, предупреждающим свертывание крови, и присоединяют ее к системе, обеспечивающей постоянную регистрацию артериального давления. В бедренную вену вставляют иглу или катетер, наполненную антикоагулянтом. Через них вводят раствор гистамина дигидрохлорида (*раствор сравнения*) и испытуемый образец. Для предупреждения свертывания крови применяют раствор гепарина, содержащий 50 ЕД в 1 мл раствора натрия хлорида с концентрацией 9 г/л или 25 % раствор магния сульфата.

В качестве *раствора сравнения* используют растворы гистамина дигидрохлорида ч. или ч.д.а. разной концентрации, в пересчете на гистамин-основание (коэффициент пересчета с гистамина дигидрохлорида на гистамин-основание равен 0,6038).

Определение депрессорных веществ возможно одним из двух вариантов.

Вариант 1

Для приготовления *растворов сравнения* и лекарственных средств используют в основном, 0,9 % раствор натрия хлорида для инъекций или воду для инъекций. Концентрация *растворов сравнения* в пересчёте на гистамин-основание должна составлять 0,5 мкг/мл (*раствор 1*) и 1,0 мкг/мл (*раствор 2*).

Введение растворов на протяжении всего испытания проводят со скоростью 0,1 мл в секунду.

В начале испытания проверяют чувствительность животного к гистамину. Для этого в вену последовательно вводят *раствор 1 и раствор 2* в объёме 0,2 мл на 1 кг массы тела кошки. Животных, у которых при введении *раствора 2* величина артериального давления снизится менее чем на 20 мм рт.ст., из испытания исключают. *Раствор 1* вводят дважды, чтобы подтвердить стабильность реакции артериального давления кошки.

После восстановления артериального давления кошке однократно вводят раствор испытуемого образца, в объеме и концентрации, которые указаны в частной статье.

Интервал между введением испытуемых образцов должен быть не менее чем 5 минут, если в частной статье не указано иное.

При анализе на одном животном двух и более испытуемых образцов перед каждой инъекцией лекарственного средства, необходимо проверять величину снижения артериального давления на введение *раствора 1.* В случае значительного уменьшения реакции артериального давления на

введение *раствора 1* по сравнению с величиной, полученной после его введения в начале испытания, необходимо вновь проверить чувствительность животного к действию *раствора 2*. Если снижение артериального давления составляет не менее 20 мм рт.ст., продолжают проводить испытание в соответствии с указанными выше требованиями.

Испытуемый образец в исследуемой тест-дозе считают, выдержавшим испытание, если за период введения раствора и последующих 60 с снижение артериального давления не превышает реакцию на введение *раствора 1*.

Вариант 2 (в соответствии с Европейской фармакопеей)

Перед проведением испытания готовят раствор испытуемого образца. Испытуемый образец растворяют или разводят в растворе натрия хлорида с концентрацией 9 г/л или в другом растворителе, указанном в частной статье, и взятом в количестве, достаточном для получения необходимой концентрации.

Для определения чувствительности кошки к гистамину готовят *растворы сравнения* с концентрацией 0,1 мкг/мл (*раствор 1*) и 0,15 мкг/мл (*раствор 2*). Затем животному через равные промежутки времени вводят *раствор 1 и раствор 2* в дозах 0,1 мкг/1,0 мл и 0,15 мкг/1,0 мл гистамина на килограмм массы тела соответственно. Введение *раствора 1* повторяют не менее трех раз. Вторую и последующие инъекции данного раствора проводят не ранее, чем через одну минуту после того, как артериальное давление вернется к уровню, наблюдавшемуся перед предыдущей инъекцией. Животное используют в испытании в случае, если *при повторных введениях раствора 1* регистрируют близкие значения снижения артериального давления, а при введении *раствора 2* – более выраженную реакцию.

Перед инъекцией испытуемого образца вводят раствор сравнения 1 в объеме 1,0 мл на килограмм массы тела. Затем – две последовательные инъекции раствора испытуемого образца в объеме и концентрации, указанных в частной статье. Далее выполняют инъекцию *раствора 1* (1,0 мл на килограмм массы), а вторую, третью и четвертую инъекции *раствора 1*

проводят не ранее, чем через одну минуту после того, как артериальное давление возвращается к уровню, наблюдаемому перед предыдущей инъекцией. Эту серию инъекций повторяют дважды и завершают испытание введением 1,5 мл *раствора 1* на килограмм массы тела.

Если реакция на *введение раствора 1 в дозе 1,5 мл/кг* не превышает реакцию на дозу 1,0 мл/кг, результаты испытания признают недостоверными. Испытуемый образец также не выдерживает испытание, если среднее значение реакции на его введение превышает среднее значение реакции на *введение раствора 1 в дозе 1,0 мл/кг*, или введение испытуемого образца вызывает более сильную депрессорную реакцию, чем ответ на *раствор 1* в дозе 1,5 мл/кг.

Животное не следует использовать в дальнейшем:

- если любая из испытуемых доз *раствора 1* (1,0 мл/кг) вызывает более выраженную депрессорную реакцию, чем завершающая доза *раствора 1* (1,5 мл/кг).

- если ответ на введение *раствора 1* в дозе 1,5 мл/кг, после испытуемого образца, меньше, чем средний ответ на инъекцию *раствора 1* в дозе 1,0 мл/кг.

Биологические методы оценки активности лекарственного растительного сырья и лекарственных препаратов, содержащих сердечные гликозиды	**ОФС.1.2.4.0009.15** **Взамен ГФ X** **Взамен ст. ГФ XI, вып. 2** **Взамен ГФ XII, ч.1,** **ОФС 42-0065-07**

К лекарственному растительному сырью и лекарственным растительным препаратам, для которых проводится биологическая оценка активности сердечных гликозидов, относятся:

1. Листья наперстянки пурпуровой, крупноцветковой и их лекарственные препараты.
2. Лекарственные препараты наперстянки шерстистой.
3. Трава, лекарственные препараты горицвета.
4. Трава, листья, цветки ландыша, лекарственные препараты ландыша, сложные лекарственные формы, содержащие настойку ландыша.
5. Семена и лекарственные препараты строфанта.
6. Трава и семя желтушника раскидистого (серого), сложные лекарственные формы, содержащие желтушник серый и др.

Принцип метода биологической оценки

Биологическая оценка указанных выше лекарственных средств основана на способности сердечных гликозидов в токсических дозах вызывать систолическую остановку сердца животных.

Активность лекарственных средств, содержащих сердечные гликозиды, оценивают по сравнению с активностью стандартных образцов и выражают в единицах действия (ЕД).

Испытания проводят на лягушках разных видов. Устанавливают

наименьшие дозы стандартного образца и испытуемого лекарственного средства (испытуемого лекарственного растительного сырья/препарата), вызывающие систолическую остановку сердца подопытных животных. Затем рассчитывают содержание единиц действия в 1 г испытуемого лекарственного средства (ИЛС), если испытывается лекарственное растительное сырье или сухие концентраты; в одной таблетке – при испытании таблеток или в 1 мл, если испытываются жидкие лекарственные формы.

Стандартные образцы и понятие единицы действия

Стандартным образцом (СО) при испытании лекарственного растительного сырья и лекарственных препаратов ландыша, комплексных лекарственных препаратов, содержащих настойку ландыша, служат специально изготовленные спиртовые экстракты ландыша, содержащие очищенную от сопутствующих веществ сумму сердечных гликозидов ландыша.

СО при испытании лекарственного растительного сырья и лекарственных препаратов наперстянки пурпуровой и крупноцветковой служат специально полученные спиртовые экстракты наперстянки указанных видов, содержащие очищенную от сопутствующих веществ сумму сердечных гликозидов.

Стандартными образцами при испытании другого лекарственного растительного сырья и полученных из него лекарственных препаратов служат индивидуальные кристаллические гликозиды: при испытании лекарственных препаратов наперстянки шерстистой – целанид-стандарт; при испытании лекарственного растительного сырья и препаратов горицвета – цимарин-стандарт; при испытании лекарственного растительного сырья и лекарственных препаратов строфанта – строфантин G-стандарт; лекарственного растительного сырья и лекарственных препаратов желтушника серого – эризимин-стандарт.

Биологическую активность стандартных образцов устанавливают на

лягушках-самцах (*Rana temporaria*) массой 28 – 33 г при подкожном введении в октябре-ноябре (таких лягушек условно называют «стандартными» или «нормальными»).

При испытании на лягушках разведения стандартных образцов подбирают с таким расчетом, чтобы одна лягушачья единица действия (1 ЛЕД) соответствовала дозе стандартного образца, вызывающей в определенных условиях опыта систолическую остановку сердца у большинства стандартных подопытных лягушек.

Под 1 ЛЕД ландыша или наперстянки подразумевают специфическую биологическую активность 0,3 мл стандартного спиртового образца, разведенного в 4 раза водой. Неразведенные стандартные образцы наперстянки и ландыша содержат в 1 мл 13,33 ЛЕД.

Под 1 ЛЕД цимарина, целанида подразумевают специфическую биологическую активность 0,3 мл стандартного спиртоводного раствора кристаллического гликозида в следующей концентрации:

цимарина	1 : 13333
целанида	1 : 5000

Под 1 ЛЕД строфантина G, эризимина подразумевают специфическую биологическую активность 0,4 мл стандартного спиртоводного раствора кристаллического гликозида в следующей концентрации:

строфантина G	1 : 20000
эризимина	1 : 25000

Метод биологической оценки сердечных гликозидов на лягушках

Отбор лягушек и условия их содержания

Для опытов пригодны лягушки-самцы видов: травяная (*Rana temporaria*) массой 28 – 40 г; водяные – озерная (*Rana ridibunda*) и прудовая (*Rana esculenta*) массой 30 – 70 г.

Лягушек содержат в течение зимы в бассейне с проточной водой в полутемном помещении при температуре от 3 до 8 °С.

Содержащиеся в течение зимы в бассейне лягушки могут быть сразу

использованы для опыта. Весной и летом свежепойманных лягушек выдерживают до начала опыта в бассейне с проточной водой в течение 2 – 3 сут. Температура воды в бассейне в теплое время года не должна превышать 15 °С. Помещение лаборатории, в которой проводят биологические испытания, должно быть светлым, но защищенным от попадания прямых солнечных лучей, температура воздуха в нем – 15 – 22 °С. В лаборатории должна находиться раковина для содержания подопытных лягушек, в которую их помещают за 1 – 1,5 ч до проведения опыта.

Техника испытания и принцип расчета

Отбирают партию лягушек одного вида, возможно близких друг к другу по массе. Взвешивание животных проводят непосредственно перед опытом с точностью до 0,5 г с отклонениями от средней массы в группе не более чем на ±2,5 г: 28 – 33, 30 – 35, 35 – 40 и до 65 – 70 г.

Лягушек по 5 штук укрепляют на досках брюшком кверху с предельно вытянутыми конечностями, булавки вкалывают в верхнюю часть морды и в суставы передних и задних конечностей.

Пинцетом захватывают кожу на груди и вырезают в ней треугольное отверстие. Вырезанный лоскут кожи откидывают в сторону. При этом становится отчетливо видимой грудина, просвечивающая через мышцы, в виде белой пластины, напоминающей по форме песочные часы. Приподняв пинцетом грудину в узкой части, тонкими ножницами перерезают ее поперек выше и ниже места наложения пинцета, так что образуется узкое поперечное оконце, через которое видны дуги аорты и предсердия. Тонким (глазным) пинцетом проникают в разрез (осторожно, чтобы не поранить предсердия и крупные сосуды), слегка вытягивают сердечную сорочку и рассекают ее ножницами. Затем легкими надавливаниями на брюшко лягушки выводят сердце наружу. При препарировании следят за тем, чтобы через образованное отверстие не выступали наружу печень и легкие, и чтобы сердце свободно помещалось на лишенном кожи участке, не прикасаясь к наружной поверхности кожи. В течение опыта обнаженное сердце каждые 15 – 20 мин

смачивают натрия хлорида раствором 0,6 % (наносят пипеткой 2 – 3 капли на обнаженное сердце).

Испытания на травяных лягушках следует проводить, вводя растворы в лимфатические бедренные мешки (под кожу) или в сердце (в полость желудочка); на водяных лягушках – в сердце (в полость желудочка) или в вену; под кожу – только растворы, содержащие гликозиды ландыша.

Лягушкам, относящимся к одной группе (5 штук), вводят одинаковые дозы испытуемого раствора.

Испытуемые препараты предварительно разводят водой с таким расчетом, чтобы 0,3 или 0,4 мл испытуемого раствора содержали 1 ЛЕД. Для этого среднее количество единиц действия лекарственного средства умножают на количество миллилитров, соответствующее 1 ЛЕД. Например, если в 1 мл препарата «Коргликон раствор 0,06 % для инъекций» содержится в среднем 13,3 ЛЕД (13,3 · 0,3 = 3,99), то препарат следует развести 1:4.

1. Метод испытания при введении под кожу. Растворы вводят шприцем с тонкой иглой в бедренные лимфатические мешки лягушек. Дозы, не превышающие 0,35 мл, вводят в одну конечность, большие дозы (но не более 0,7 мл) вводят равными частями в обе конечности.

После введения раствора наблюдают за лягушками и определяют наименьшую дозу, вызывающую систолическую остановку сердца у большинства из 5 лягушек данной группы в течение 1 ч, если испытывают лекарственное растительное сырье и лекарственные препараты наперстянки, ландыша, горицвета; или в течение 2 ч, если испытывают лекарственное растительное сырье и лекарственные препараты строфанта или желтушника. Если в течение этого времени отчетливой остановки сердца не произошло, продолжают наблюдение еще 10 мин (при длительности наблюдения 1 ч) и учитывают также количество лягушек, у которых остановка сердца наступила в дополнительное время. Длительность систолической остановки сердца должна быть не менее 15 мин. Лягушек, у которых сердце начинает вновь сокращаться ранее, чем через 15 мин после остановки, в расчет не

принимают.

В протоколах опытов отмечают время введения ИЛС и результаты опытов для каждой лягушки в отдельности. Каждое отдельное испытание начинают с определения чувствительности данной партии лягушек к стандартному образцу. С этой целью нескольким группам (по 5 лягушек с одинаковой массой тела в каждой) вводят различные дозы стандартного образца: первой группе – дозу, соответствующую 1 ЛЕД (по 0,3 или 0,4 мл в зависимости от образца); другим – на 0,05 – 0,1 мл больше. Находят наименьшую дозу стандартного образца, вызывающую остановку сердца у большинства из 5 лягушек. Если остановка наблюдается у всех лягушек, то переходят к испытанию меньшей дозы, а если остановки были у одного или двух животных или не наблюдались вообще, то доза ИЛС увеличивается. Таким образом, определяется чувствительность опытной партии лягушек по сравнению со стандартными лягушками. Затем в тех же условиях опыта группе из 5 лягушек той же партии вводят раствор ИЛС в дозе, соответствующей найденной наименьшей дозе стандартного образца, и наблюдают за животными в течение 1 или 2 ч (в зависимости от того, какое лекарственное средство испытывается). Если в результате наблюдений будет установлено, что введенная доза недостаточна или слишком велика, дозу увеличивают или уменьшают, причем разница между дозами должна быть не более 0,1 мл. Опыты проводят до тех пор, пока не будет найдена наименьшая доза ИЛС, вызывающая систолическую остановку сердца у большинства из 5 лягушек.

Далее рассчитывают содержание единиц действия (X) в 1 мл, 1 г или в 1 таблетке ИЛС.

Для лекарственного растительного сырья и лекарственных препаратов наперстянки, ландыша, горицвета расчет проводят по формуле:

$$X = \frac{B \cdot K}{0{,}3 \cdot A},$$

где A – наименьшая доза в мл, установленная для раствора ИЛС;

B – наименьшая доза в мл, установленная для раствора стандартного образца;
0,3 – доза в мл, соответствующая 1 ЛЕД;
K – число, обозначающее разведение ИЛС.

Для лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов строфанта и желтушника расчет проводят по формуле:

$$X = \frac{B \cdot K}{0{,}4 \cdot A},$$

2. Метод испытания при введении в полость желудочка сердца. Испытуемые растворы, предварительно освобожденные от избытка спирта (его концентрация не должна превышать 10 %) и летучих веществ, в соответствующем разведении вводят лягушкам непосредственно в полость желудочка сердца со скоростью 0,1 мл в 5 с, прокалывая его в момент диастолы тонкой иглой, соединенной со шприцем с делением 0,02 мл. Иглу вынимают из полости желудочка во время систолы, чтобы избежать кровотечения в месте укола.

Для определения наименьшей дозы раствора СО и ИЛС травяным лягушкам вводят примерно 0,2 мл лекарственного препарата наперстянки, ландыша, горицвета или 0,3 мл лекарственного препарата строфанта, желтушника. Допустимое отклонение между вводимыми дозами – 0,02 мл.

При определении активности на водяных лягушках рассчитывают вводимую дозу на 1 г массы тела. Для того чтобы не рассчитывать каждый раз дозу на введение, предлагается таблица расчетных доз. Допустимое отклонение между вводимыми дозами должно быть не более 0,0005 мл на 1 г массы лягушки. Наименьшими дозами обычно являются 0,004 – 0,006 мл раствора на 1 г массы лягушки.

Таблица – Дозы лекарственного средства в мл, рассчитанные для водяных лягушек, при оценке лекарственных средств, содержащих сердечные гликозиды, при внутрисердечном и внутривенном пути введения

Средняя масса лягушки, г	**Доза лекарственного средства на 1 г массы лягушки, мл**									
	0,0030	**0,0035**	**0,0040**	**0,0045**	**0,0050**	**0,0055**	**0,0060**	**0,0065**	**0,0070**	**0,0075**
30	0,09	0,10	0,12	0,14	0,15	0,17	0,18	0,20	0,21	0,23
35	0,11	0,12	0,14	0,16	0,18	0,19	0,21	0,23	0,25	0,26
40	0,12	0,14	0,16	0,18	0,20	0,22	0,24	0,26	0,28	0,30
45	0,14	0,16	0,18	0,20	0,23	0,25	0,27	0,29	0,32	0,34
50	0,15	0,18	0,20	0,23	0,25	0,28	0,30	0,33	0,35	0,38
55	0,17	0,19	0,22	0,25	0,28	0,30	0,33	0,36	0,39	0,41
60	0,18	0,21	0,24	0,27	0,30	0,33	0,36	0,39	0,42	0,45
65	0,20	0,23	0,26	0,29	0,33	0,36	0,39	0,42	0,46	0,49
70	0,21	0,25	0,28	0,32	0,35	0,39	0,42	0,46	0,49	0,53
75	0,23	0,26	0,30	0,34	0,38	0,41	0,45	0,49	0,53	0,56

Длительность наблюдения за лягушками – 15 мин, если испытывают лекарственное растительное сырье и лекарственные препараты наперстянки, ландыша, горицвета; для лекарственных препаратов строфанта, желтушника – 20 мин. Если в течение этого времени отчетливой остановки сердца не произошло, наблюдение продолжают еще 5 мин. Лягушек, у которых сердце начинает вновь сокращаться ранее, чем через 5 мин после остановки, в расчет не принимают.

Вычисляют содержание ЛЕД в 1 мл, 1 г или в 1 таблетке испытуемого образца по формулам, приведенным для подкожного введения, но значения *A* и *B* зависят от принципа расчета доз, т.е. от вида использованных лягушек:

A – наименьшая доза (в мл на массу травяной лягушки или в мл на 1 г массы водяной лягушки), установленная для раствора ИЛС;

B – наименьшая доза (в мл на массу травяной лягушки или в мл на 1 г массы водяной лягушки), установленная для раствора стандартного образца.

3. Метод испытания при введении в вену. У лягушек проводят поперечный разрез кожи на уровне ключиц, затем по средней линии живота до симфиза, где надсекают кожу вправо и влево. Образовавшиеся лоскуты кожи отводят в стороны. На внутренней поверхности после отведения в сторону лоскутов кожи с каждой стороны видна большая кожная вена в виде

петли, идущей по поверхности прямой мышцы живота от кожи спины книзу, а затем снова вверх, где она впадает в верхнюю полую вену. Затем выводят наружу сердце аналогично методу испытания при введении под кожу. Доску с группой препарированных лягушек поворачивают так, чтобы их головы были обращены к экспериментатору для удобства введения иглы в нисходящее колено петли вены лягушки.

При внутривенном введении лягушкам растворов СО и ИЛС в соответствующем разведении, освобожденных от избытка спирта и летучих веществ, рассчитывают вводимую дозу на 1 г массы тела (таблица).

Относящимся к одной группе 5 лягушкам вводят в вену одинаковые дозы раствора стандартного образца или ИЛС тонкой иглой, соединенной со шприцем вместимостью 1 мл, со скоростью 0,1 мл за 5 с. После каждого введения накладывают кровоостанавливающие зажимы, которые не снимают до конца опыта. Время наблюдения за остановкой сердца лягушки – 15 мин, если испытывают лекарственное растительное сырье и лекарственные препараты наперстянки, ландыша, горицвета; для лекарственных препаратов строфанта, желтушника – 20 мин. Если в течение этого времени отчетливой остановки сердца не произошло, наблюдение продолжают еще 5 мин; о результатах судят по изменениям, наступающим в дополнительное время.

Определение наименьшей дозы стандартного образца и ИЛС, вызывающей систолическую остановку сердца у большинства лягушек из 5, проводят так же, как при введении под кожу. Допустимое отклонение между вводимыми дозами должно быть не более 0,0005 мл на 1 г массы лягушки.

Наименьшими дозами обычно являются 0,004 – 0,006 мл раствора на 1 г массы лягушки.

Вычисляют содержание ЛЕД в 1 мл, 1 г или в 1 таблетке ИЛС по формулам, приведенным для подкожного введения, но с другими обозначениями *A* и *B*:

A – наименьшая доза (в мл на 1 г массы лягушки), установленная для раствора ИЛС;

B – наименьшая доза (в мл на 1 г массы лягушки), установленная для раствора стандартного образца.

Определение антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар	**ОФС. 1.2.4.0010.18** **Взамен ОФС. 1.2.4.0010.15**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на методы определения активности антибиотиков с использованием чувствительных микроорганизмов.

Определение антимикробной активности антибиотиков основано на их способности угнетать рост микроорганизмов. Определение проводят методом диффузии в агар на плотной питательной среде путем сравнения размеров зон угнетения роста тест–штаммов микроорганизмов, которые образуются при испытании растворов стандартного образца и испытуемого препарата определенных концентраций. Метод основан на логарифмической зависимости размеров зон угнетения роста тест–микроорганизмов от концентрации антибиотика, которая должны быть линейной.

Антимикробная активность антибиотиков выражается в единицах действия — ЕД или «мкг» на единицу объема препарата. Для большинства антибиотиков 1 ЕД или 1 мкг соответствуют 1 мкг активного вещества (кислоты или основания); для антибиотиков, имеющих иное количественное выражение единицы, соответствующие указания даются в фармакопейных статьях.

При определении антимикробной активности антибиотиков используют стандартные образцы, активность которых, как правило, устанавливают в соответствии с международными биологическими стандартами. При отсутствии последних для указанных целей могут быть использованы химические

стандартные образцы, антимикробную активность которых рассчитывают на основании показателей качества, установленных физико–химическими методами. Антимикробную активность стандартных образцов антибиотиков, не имеющих аналогов в международной коллекции стандартов, рассчитывают также на основании показателей качества, установленных физико–химическими методами.

Стандартные образцы антибиотиков хранятся и используются в соответствии с рекомендациями, указанными на этикетке стандартного образца.

Методика испытания

Тест–микроорганизмы, растворители, буферные растворы, питательные среды и прочие условия проведения испытания указаны в табл. 1.

В стеклянные или пластмассовые чашки Петри размером 20×100 мм или 20×90 мм, установленные на столиках со строго горизонтальной поверхностью, разливают расплавленные питательные среды определенного состава в 1 или 2 слоя. Для нижнего слоя используют стерильные незасеянные среды, для верхнего или одного слоя — стерильную агаровую среду, предварительно засеянную соответствующим тест–микроорганизмом. Если культура представляет собой суспензию вегетативных клеток, то температура расплавленной среды, в которую вносят тест–штамм, должна быть (49 ± 1)°С; при использовании суспензии спор – от 65 до 70 °С. К среде следует добавить такое количество суспензии вегетативных клеток или спор, которое обеспечивает оптимальный рост тест–микроорганизма и четкость зон угнетения его роста. Количество посевной дозы определяют опытным путем, начиная с объема суспензии микроорганизмов, указанного в табл. 2. Оптимальное количество посевной дозы должно быть таким, чтобы диаметр зон угнетения для минимальной концентрации антибиотика был не менее 14 мм.

Стерильные цилиндры (6 штук) единого размера и массы высотой (10,0±0,1) мм и внутренним диаметром (6,0 ± 0,1) мм из нержавеющей стали

или алюминия расставляют на поверхности засеянной среды на равном расстоянии друг от друга и от края чашки. Вместо цилиндров могут быть использованы лунки диаметром от 6 до 8 мм, сделанные в толще агара с помощью стерильного сверла, либо другого соответствующего приспособления.

В цилиндры или лунки каждой чашки вносят равные объемы рабочих растворов стандартного и испытуемого образцов антибиотика. Основные растворы стандартных и испытуемых образцов готовят в стерильных растворителях с концентрацией 1 мг/мл. Затем из основных растворов в зависимости от применяемого варианта метода диффузии в агар (трехдозного или с построением стандартной кривой) готовят рабочие растворы трех или одной концентраций испытуемого образца и растворы трех или пяти концентраций стандартного образца. Рабочие растворы испытуемых образцов готовят из основных растворов таким образом, чтобы их концентрации не имели существенных отличий от концентраций раствора стандартного образца.

Для уменьшения влияния колебаний во времени между закапыванием растворов, используемых в опыте, рекомендуется после внесения выдерживать их в чашках при комнатной температуре в течение 1—2 ч. Затем чашки инкубируют при температуре (36 ± 1) °С в течение 16—18 ч.

Диаметры зон угнетения роста тест–микроорганизма при помощи соответствующих приборов измеряют с точностью до 0,1 мм.

Определение антимикробной активности антибиотиков с использованием трехдозного варианта метода диффузии в агар. Для проведения испытания готовят 3 раствора стандартного образца (C_1, C_2, C_3) и 3 раствора испытуемого образца ($И_1$, $И_2$, $И_3$). Концентрации растворов, содержащих малую, среднюю и большую дозы, должны находиться между собой в кратном соотношении (1:2:4). При необходимости это соотношение может быть изменено. Концентрация раствора C_2 должна быть близка к контрольной концентрации раствора стандартного образца, указанной в табл. 2.

Все растворы стандартного и испытуемого образцов вносят в цилин-

дры или лунки одной чашки Петри таким образом, чтобы растворы с большими концентрациями не соприкасались между собой. Предлагаемый вариант закапывания: $С_1И_3С_2И_1С_3И_2$.

Число чашек, используемых в каждом опыте, должно быть достаточным для обеспечения статистической достоверности результатов, но не менее 6 штук.

Последовательность внесения растворов стандартного и испытуемого образцов в цилиндры или лунки каждой чашки должна быть следующей: первым вносят раствор с малой концентрацией стандартного образца ($С_1$) и соответствующий раствор испытуемого образца ($И_1$), затем растворы со средней концентрацией ($С_2$ и $И_2$), последними вносят растворы с большими концентрациями ($С_3$ и $И_3$).

Допускается проводить испытание с использованием квадратных чашек Петри размером 20×245×245 мм, при этом растворы стандартного образца и испытуемого препарата вносятся по схеме латинского квадрата. Количество среды и объем суспензии тест–микроорганизма подбирают опытным путем.

Расчет активности и дисперсионный анализ при использовании трехдозного варианта метода диффузии в агар осуществляют в соответствии со статьей ОФС «Статистическая обработка результатов определения специфической фармакологической активности лекарственных средств биологическими методами», при проведении испытания с использованием круглых чашек Петри расчет проводят в соответствии с разделом 3.2. (Обработка результатов трехдозовой постановки рандомизированной), квадратных – с разделом 3.5. (Обработка результатов трехдозовой постановки методом латинского квадрата). Растворы определенных концентраций стандартного (*С*) и испытуемого (*И*) образцов обозначены S и U соответственно.

Условия получения достоверных результатов с использованием трехдозного варианта метода диффузии в агар: соотношение 2 последовательных

доз должно быть постоянным; число разведений рабочих концентраций должно быть одинаково для стандартного и испытуемого образца; взаимосвязь между логарифмом доз и диаметром зон угнетения роста должна быть представлена в виде прямой линии во всем диапазоне исследованных доз; прямая линия испытуемого должна быть параллельна соответствующей прямой линии стандартного образца.

Определение антимикробной активности антибиотиков с использованием стандартной кривой. В день постановки анализа из основного раствора готовят 5 рабочих растворов стандартного образца C_1; C_2; C_3; C_4; C_5 с концентрациями, увеличивающимися в геометрической прогрессии (Z), обычно в соотношении 1:1,25. Средняя концентрация (C_3) является контрольной и должна быть близка к концентрации, указанной в табл. 2: концентрация C_1 – наименьшая, C_5 — наибольшая. Для исследования растворов каждой концентрации (кроме контрольной) используют по 3 чашки. Раствор контрольной концентрации C_3 закапывают в 3 цилиндра (или лунки) каждой из взятых в опыт чашек, в 3 другие цилиндра (лунки) закапывают раствор одной из концентраций стандартного образца, чередуя его с раствором контрольной концентрации. Таким образом, для построения стандартной кривой используют 12 чашек.

После инкубации в термостате измеряют диаметры зон угнетения роста тест–микроорганизмов. Далее вычисляют среднюю величину диаметров зон для раствора контрольной концентрации стандартного образца в каждой группе из 3 чашек, затем среднюю величину диаметров зон для раствора контрольной концентрации стандартного образца из всех 12 чашек (общую среднюю из 36 зон). По разности между средней величиной зоны контрольной концентрации, установленной из 12 чашек, и средней величиной зоны контрольной концентрации, установленной из 3 чашек с каждой отдельной концентрацией, находят поправку к величине зоны данной концентрации.

Найденную поправку прибавляют к средней величине диаметра зоны

данной концентрации, если она положительная, и вычитают, если она отрицательная.

Пример. Общая средняя величина зоны для раствора контрольной концентрации стандартного образца 1 мкг/мл, рассчитанная из 36 зон, равна 19,2 мм. Средняя величина зоны для раствора той же концентрации, установленная из 3 чашек, на которых испытывался раствор с концентрацией 0,83 мкг/мл стандартного образца, равна 19 мм. Следовательно, величина поправки будет + 0,2 мм. Средняя величина зоны для концентрации 0,83 мкг/мл равна 17,9 мм; прибавляя поправку +0,2 мм, получаем величину 18,1 мм. Таким образом исправляют значение величины зон для растворов всех концентраций стандартного образца и получают величины d_1; d_2; d_4; d_5.

Для исследования активности испытуемого образца проводят несколько определений, используя для каждого по 3 чашки, в которые закапывают раствор контрольной концентрации стандартного образца и раствор испытуемого образца с концентрацией, близкой к контрольной. Внесение растворов контрольной концентрации стандартного и испытуемого образцов в каждой группе из 3 чашек должно проводиться одномоментно. После инкубации измеряют зоны угнетения роста тест–микроба, образуемые растворами контрольной концентрации стандартного и испытуемого образцов. Находят среднее значение величин зон из 3 чашек.

Расчет антимикробной активности испытуемых образцов по стандартной кривой может быть проведен 2 способами: графическим методом или путем непосредственного расчета с использованием соответствующих формул.

Таблица 1— **Характеристика культуральных, морфологических и тинкториальных свойств тест–штаммов микроорганизмов**

Название тест–микроба	Рост на плотной питательной среде		Рост на жидкой питательной среде		Морфологические и тинкториальные свойства (окраска по Граму)
	условия выращивания	культуральные свойства	условия выращивания	культуральные свойства	
Staphylococcus aureus 209 Р	Среда №1, (36 ±1)°С, 18–20ч, затем при комнатнойтемпературе 24ч	Колонии гладкие с ровными краями, с равномерной золотистой пигментацией	Мясопептонный бульон (МПБ) (рН 7,2–7,4), 18–20ч	Равномерное помутнение бульона без пленки и слизистого осадка на дне	Однородные по величине и расположению грамположительные кокки в виде гроздьев
Candida utilis РКПГУ 1270/ ЛИА–01	Среда №3, (30 ± 1)°С, 48 ч	Круглые колонии кремового цвета с матовой поверхностью и ровными краями	МПБ с 1% глюкозой (рН 7,2–7,4), 18–20 ч	Рост в виде равномерной мути и осадка на дне	Овальные клетки, иногда с отростками; расположены отдельно, цепочками или группами
Bacillus subtilis, var. $Л_2$	Среда №1, (36 ±1)°С, 18–20 ч	Колонии желтоватого цвета, круглой формы, влажно блестящие с шагреневой поверхностью, слегка зазубренными краями и приподнятым центром	МПБ (рН 7,2–7,4), 18–20 ч	Рост в виде пленки с осадком на дне	Крупные палочки с закругленными концами, располагающиеся отдельно и цепочками с хорошо выраженной грамположительной окраской
Bacillus subtilis АТСС 6633	Среда №1, (36 ±1)°С, 18–20 ч	Мелкие сероватые колонии с зубчатым краем	МПБ (рН 6,8–7,0), 18–20 ч	Рост в виде пленки с осадком на дне	Тонкие палочки, располагающиеся отдельно или цепочками, с хорошо выраженной грамположительной окраской

Bacillus cereus, var. *mycoides* 537	Среда №2, (36±1)°С, 18–20 ч	Шероховатые колонии с краем, сформированным из переплетающихся волокон	МПБ (рН 7,8–8,0), 18–20 ч	Морщинистая пленка; вся среда прозрачная, без осадка	Палочки с закругленными концами, располагающиеся отдельно или цепочками, с хорошо выраженной грамположительной окраской
Bacillus cereus, var. *mycoides* НВ	Среда №1, (36±1)°С, 18–20 ч	Гладкие колонии с ровными краями и сферической поверхностью	МПБ (рН 6,8–7,0), 18- 20 ч	Равномерное помутнение бульона без образования пленки и осадка	Тонкие с закругленными концами палочки, располагающиеся отдельно или короткими цепочками, с хорошо выраженной грамположительной окраской
Bacillus pumilus NCTC 8241	Среда №1, (36 ±1)°С, 18–20 ч	Мелкие серовато–голубого цвета колонии с зазубренными краями и приподнятым центром	МПБ (рН 7,2–7,4), 18–20 ч	Равномерное помутнение бульона без образования пленки и осадка	Тонкие, мелкие палочки с закругленными концами, располагающиеся отдельно или короткими цепочками, с хорошо выраженной грамположительной окраской
Bordetella bronchiseptica ATCC 4617	Мясопептонный агар (МПА) (рН 7,2—7,4) (36 ±1)°С, 18—20 ч	Мелкие, мутные, белые, слегка выпуклые, фарфоровидные колонии	МПБ (рН 7,2—7,4), 18– 20 ч	Заметное помутнение, серая пленка, тягучий осадок	Одиночные, короткие, тонкие палочки с хорошо выраженной грамотрицательной окраской
Pseudomonas aeruginosa NCTC 2134	МПА (рН 7,2-7,4) (36 ±1)°С, 18–20 ч	Широкие, расплывчатые, прозрачные с неровным краем колонии, среда может приобретать желтовато–зеленую окраску	МПБ (рН 7,2–7,4), 18–20 ч	Заметное помутнение, толстая пленка, среда может приобретать желтовато–зеленую окраску	Одиночные палочки или короткие цепочки с хорошо выраженной грамотрицательной окраской

Таблица 2 — **Тест–микроорганизмы и условия для биологического определения активности антибиотиков**

Антибиотик[1]	Тест микро–организмы[2]	Среда для определения активности[3,4]		Количество среды на каждую чашку, мл[5]		Посевная доза[6]	Стандарт–ный образец	Растворитель для приготовления растворов стандартного и испытуемого образцов		Срок годности основного раствора стандартного образца при 4–10°С, сут	Контроль–ная концен–трация раствора стандарт–ного образца[7,8], мкг/мл акт. вещества или ЕД/мл
		ниж–ний слой	верх–ний слой	нижний слой	верх–ний слой			основной раствор	рабочий раствор		
Азитромицин	*Bacillus cereus*, var. *mycoides* НВ		№9		10	20 млн. спор на 1 мл среды	Азитромицина дигидрат	1 мл этилового спирта на 10 мг навески, буфер №4	Буфер №4	1	4 мкг/мл
Амикацин	*Bacillus subtilis* АТСС 6633	№ 8	№8 + 0,1% глюкозы	10	5		Амикацин или Амикацина сульфат	Дистиллирован–ная вода	Буфер№4	14	10 мкг/мл
Ампициллин	*Staphylococcus aureus 209 P*	№11	№7 + 0,1% глюкозы	10	5	40 млн микробных клеток на 1 мл среды	Ампициллина тригидрат	Буфер №1	Буфер №1	3	1 мкг/мл

Амфотерицин В	*Candida utilis РКПУ 1270/ЛИА–01*		№16 + 0,1% глюкозы		15	3 мл рабочей взвеси на 100 мл среды	Амфотерицин В	Диметилсульф–оксид	Буфер №1[11]	1	0,5 мкг/мл
Бензилпенициллин	*Staphylococcus aureus* 209 Р	№11	№7 + 0,1% глюкозы	10	5	40 млн микробных клеток на 1 мл среды	Бензилпени–циллина натриевая соль	Буфер №1	Буфер №1	3	1 ЕД/мл
Блеомицетин	*Bacillus subtilis ATCC 6633*		№9[14] pH 6,9–7,0 25 г агара на 1000 мл		20	10 млн спор на 1 мл среды	Блеомицетина гидрохлорид	Вода очищенная	Вода очищенная	14	3 мкг/мл
Ванкомицин	*Bacillus subtilis ATCC 6633*		Примечание 15	15	7	20 млн спор на 1 мл среды	Ванкомицина гидрохлорид	Вода очищенная	Буфер № 4	1	100 ЕД/мл
Гелиомицин	*Bacillus subtilis ATCC 6633*	№17	№17		15	100 млн спор на 1 мл среды	Гелиомицин	0,1М. раствор натрия гидроксида[13]	0,1N раствор натрия гидроксида	10	4 мкг/мл
Гентамицин	*Bacillus pumilus* NCTC 8241		№9	20	5	50 млн спор на 1 мл среды	Гентамицина сульфат	Буфер №4	Буфер №4	14	2 мкг/мл
Грамицидин С	*Bacillus cereus var. mycoides 537*		№13		10	8 млн спор на 1 мл среды	Грамицидин С	Этиловый спирт 95%	Вода очищенная	30	100 мкг/мл
Дактиномицин	*Bacillus cereus*, var. *mycoides* НВ		№14		10	20 млн спор на 1 мл среды	Дактиномицин	Вода очищенная[9]	Буфер №4	15	4 мкг/мл
Дигидрострептомицин	*Bacillus cereus*, var. *mycoides* 537		№9		10	20 млн спор на 1 мл среды	Дигидрострепптомицина сульфат	Буфер №3	Буфер №4	30	2 мкг/мл

Диклоксациллин	*Staphylococcus aureus* 209 Р	№11	№7 +0,1% глюкозы	10	5	40 млн микробных клеток на 1 мл среды	Диклоксацил–лина натриевая соль	Буфер №1	Буфер №1	6	8 мкг/мл
Доксициклин	*Bacillus subtilis*, var. $Л_2$		№6+1% глюкозы		10	30 млн спор на 1 мл среды	Доксициклина гидрохлорид	0,01М раствор хлористоводо–родной кислоты	Буфер №2	7	0,5 мкг/мл
Канамицин В[10]	*Bacillus subtilis ATCC 6633*	№12	№8	10	5	100 млн спор на 1 мл среды	Канамицина моносульфат	Вода очищенная	Буфер №4	30	1 мкг/мл
Капреомицин	*Bacillus subtilis* АТСС 6633	№11	№7 + 1% глюкозы	15	7	100 млн спор на 1 мл среды	Капреомицина сульфат	Вода очищенная	Вода очищенная	7	100 мкг/мл
Карбенициллин	*Pseudomonas aeruginosa NCTC 2134*		№7		15	10 мл бульонной культуры на 100 мл среды	Карбеницил–лина динатриевая соль	Буфер №1	Буфер №2	3	10 мкг/мл
Карминомицин	*Bacillus cereus*, var. *mycoides* 537		№5		15	100 млн спор на 1 мл среды	Карминомици–на гидрохлорид	Вода очищенная	Буфер №4	10	15 мкг/мл
Леворин	*Candida utilis РКПУ 1270/ЛИА–01*		№16+1% глюкозы		15	2—2,5 мл рабочей взвеси на 100 мл среды	Леворин	Диметилсульф–оксид	Диметилсульф–оксид до концентрации 100 мкг/мл, а затем в буфере №1[11]	3(10)	0,5 мкг/мл
Линкомицин	*Bacillus subtilis* АТСС 6633		№8		10	100 млн спор на 1 мл среды	Линкомицина гидрохлорид	Вода очищенная	Буфер №4	30	100 мкг/мл
Метациклин	*Bacillus subtilis var. Л2*		№6+1% глюкозы		10	30 млн спор на 1 мл среды	Метациклина гидрохлорид	0,01М раствор хлористо–водородной кислоты	Буфер №2	7	0,5 мкг/мл

Метициллин	*Staphylococcus aureus* 209 Р	№11	№7+0,1% глюкозы	10	5	40 млн микробных клеток на 1 мл среды	Метициллина натриевая соль	Буфер №1	Буфер №1	3	20 мкг/мл
Микогептин	*Candida utilis РКПУ 1270/ЛИА–01*		№16+1% глюкозы		15	2,5—3 мл рабочей взвеси на 100 мл	Микогептин	Диметилсульф–оксид	Диметилсульф–оксид до концентрации 50 мкг/мл, а затем буфер №4[11]	З[12]	1 мкг/мл
Мономицин	*Bacillus cereus, var. mycoides 537*		№9		10	20 млн спор на 1 мл среды	Мономицин	Вода очищенная	3% раствор калия хлорида	30	2 мкг/мл
Неомицин	*Bacillus cereus, var. mycoides 537*		№9	20	5	20 млн спор на 1мл среды	Неомицина сульфат	Буфер №4	Буфер №4	30	4 мкг/мл
Нетилмицин	*Staphylococcus aureus* 209 Р	№11	№7 +0,1% глюкозы	10	5	40 млн микробных клеток на 1 мл среды	Нетилмицина сульфат	Буфер №4	Буфер №4	1	6 мкг/мл
Нистатин	*Candida utilis РКПУ 1270/ЛИА–01*		№16+1% глюкозы		15	3 — 3,5 мл рабочей взвеси на 100 мл среды	Нистатин	Диметилфор–мамид	Буфер №3	3	20 ЕД/мл
Оксациллин	*Staphylococcus aureus 209 Р*	№11	№7 +0,1% глюкозы	10	5	40 млн микробных клеток на 1 мл среды	Оксациллина натриевая соль	Буфер №1	Буфер №1	3	4 мкг/мл

Окситетрациклин	*Bacillus subtilis*, var. $Л_2$		№6+1% глюкозы		10	30 млн спор на 1 мл среды	Окситетрацик–лина гидрохло-рид	0,01М раствор хлористоводо–родной кислоты	Буфер №2	7	1 мкг/мл
Олеандомицин	*Bacillus cereus*, var. *mycoides* НВ		№9		10	20 млн спор на 1 мл среды	Олеандомицина фосфат	Буфер №3	Буфер №4	7	4 мкг/мл
Оливомицин	*Bacillus subtilis* АТСС 6633	№11		10	5	10 млн спор на 1 мл среды	Оливомицин–кислота	Стандартный образец в этиловом спирте из расчета 5 мг в 1 мл, затем буфер №1, испытуемый образец в воде очищенной	Буфер №1	14	2 мкг/мл
Полимиксин В	*Bordetella bronchiseptica* АТСС 4617		№15		10	40 – 60 млн микробных клеток на 1 мл среды	Полимиксин В сульфат	Буфер №3	Буфер №5	14	100 ЕД/мл
Полимиксин М	*Bordetella bronchiseptica* АТСС 4617		№15		10	40 – 60 млн микробных клеток на 1 мл среды	Полимиксин М сульфат	Буфер № 3	Буфер № 5	14	100 ЕД/мл
Рифампицин	*Bacillus subtilis ATCC 6633*		№10+0,1 % глюкозы		10	40 млн спор на 1 мл среды	Рифампицин	1 мл диметил-форм–амида на 10 мг навески, затем вода очищенная	Буфер №3	4	5 мкг/мл

Рубомицин	*Bac. cereus*, var. *mycoides* 537		№5		15	10 млн спор на 1 мл среды	Рубомицина гидрохлорид	Вода очищенная	Буфер №4	10	20 мкг/мл
Сизомицин	*Bacillus pumilus* NCTC 8241	№12	№8	20	5	50 млн спор на 1 мл среды	Сизомицина сульфат	Буфер №4	Буфер №4	14	2 мкг/мл
Стрептомицин	*Bacillus cereus*, var. *mycoides* 537		№9		10	20 млн спор на 1 мл среды	Стрептомицина сульфат	Буфер №3	Буфер №4	30	2 мкг/мл
Тетрациклин	*Bacillus subtilis var Л2*		№6+1% глюкозы		10	30 млн спор на 1 мл среды	Тетрациклина гидрохлорид	0,01N. раствор хлористоводо–родной кислоты	Буфер №2	7	2 мкг/мл
Феноксиме–тилпенициллин	*Staphylcoccus Aureus 209 P*	№11	№7+0,1 % глюкозы	10	5	40 млн микробных клеток на 1 мл среды	Феноксиметил–пенициллин	Буфер №1	Буфер №1	7	1 ЕД/мл
Флоримицин	*Bacillus subtilis ATCC 6633*		№8		10	20 млн спор на 1 мл среды	Флоримицина сульфат	Вода очищенная	Буфер №4	7	10 мкг/мл

Фузидин	*Bacillus cereus*, var. *mycoides* НВ		№10+1 % глюкозы		10	50 млн спор на 1 мл среды	Фузидиевая кислота	Стандартный образец в этиловом спирте из расчета 10 мг/мл, затем буфер №4; испытуемый образец в буфере №4	Буфер №3	7	5 мкг/мл
Цефалексин	*Bacillus subtilis ATCC 6633*	№11	№7+0,1 % глюкозы	10	5	100 млн спор на 1 мл среды	Цефалексин	Буфер №1	Буфер №1	3	5 мкг/мл
Цефалотин	*Bacillus subtilis ATCC 6633*	№11	№7+0,1 % глюкозы	10	5	40 млн спор на 1 мл среды	Цефалотина натриевая соль	Буфер №1	Буфер №1	3	0,5 мкг/мл
Хлортетрациклин	*Bacillus subtilis*, var. $Л_2$		№6+1% глюкозы		10	30 млн спор на 1 мл среды	Хлортетрацик–лина гидрохло-рид	0,01 N раствор хлористоводо–родной кислоты	Буфер №2	7	1 мкг/мл
Эритромицин	*Bacillus cereus*, var. *mycoides* НВ		№9		10	20 млн спор на 1 мл среды	Эритромицин	1 мл этилового спирта на 10 мг навески, затем буфер №4 до 1000 ЕД/мл	Буфер №4	7	2 мкг/мл

[1] Условия определения антимикробной активности антибиотиков указанных наименований распространяются и на их лекарственные формы.

[2] АТСС – Американская коллекция типовых культур; NCTC – Национальная коллекция типовых культур.,

РКПГ – Российская коллекция патогенных грибов. Допускается использование других микроорганизмов, чувствительных к испытуемому антибиотику, при условии валидации методики.

[3] Состав, приготовление сред и буферных смесей см. табл. 3 и 4.

[4] Глюкозу добавляют в расплавленный агар в виде 40 % стерильного раствора, доводя до требуемой концентрации.

[5] Объемы сред указаны для чашек размером 20×100 мм. При использовании лунок количество среды для нижнего или одного слоя удваивается.

[6] Допускается уменьшение или увеличение посевной дозы тест микроорганизма в зависимости от плотности получаемого газона и четкости очертания зон.

[7] Указана контрольная концентрация раствора стандартного образца для метода с использованием стандартной кривой.

[8] Допускается при необходимости уменьшение или увеличение контрольной концентрации раствора стандартного образца.

[9] Для полного растворения препарата раствор помещают в холодильник при температуре от 4 до 10 °С.

[10] Активность канамицина В определяется после гидролиза по стандартному образцу канамицина А.

[11] Срок годности рабочих растворов в буфере при комнатной температуре не более 30 мин.

[12] Срок годности основного раствора стандартного образца микогептина при комнатной температуре не более 4–5 ч.

[13] Основной раствор готовят в концентрации 1 мг в 5 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида

[14] Среда для блеомицетина с pH 6,9–7,0 и 25 г агар–агара на 1 л.

[15] Для определения ванкомицина используется среда: пептон – 6 г, панкреатический гидролизат казеина – 4,0 г, говяжий экстракт–1,5г, дрожжевой экстракт – 3,0 г, глюкозы моногидрат – 1,0 г, агар–агар – 15 г, вода до 1л, pH (8,0±0,1).

16. Тест- микроорганизмы *Bacillus cereus*, var. *mycoides* НВ; *Bacillus cereus, var. mycoides 537; Bacillus subtilis*, var. $Л_2$ хранятся в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов **при** Федеральном государственном бюджетном учреждении «НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ЭКСПЕРТИЗЫ СРЕДСТВ МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ» (ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России); *Candida utilis РКПУ 1270/ЛИА–01* хранится в Российской коллекции патогенных грибов» при Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И.Мечникова» Министерства Здравоохранения Российской Федерации.

Расчет активности испытуемого образца графическим методом. По исправленным значениям диаметров зон d_1; d_2; d_4; d_5 для всех концентраций растворов стандартного образца C_1; C_2; C_4; C_5 и общей средней величине диаметров зон для контрольной концентрации d_3 вычисляют с использованием метода наименьших квадратов размеры зон $D_{\min}$ и $D_{\max}$ для низкой и высокой концентраций растворов стандартного образца:

$$D_{\min} = (3d_1 + 2d_2 + d_3 - d_5)/5;$$

$$D_{\max} = (3d_5 + 2d_4 + d_3 - d_1)/5,$$

по которым затем строят стандартную кривую на полулогарифмической сетке расчета биологической активности антибиотиков, откладывая на оси абсцисс величины зон, на оси ординат – соответствующие им концентрации растворов стандартного образца. Разность между найденными средними величинами зон угнетения роста тест–микроба раствором испытуемого образца и раствором контрольной концентрации стандартного образца из тех же чашек прибавляют к значению величины зоны, соответствующей контрольной концентрации на кривой (D_3). Затем по кривой находят концентрацию, соответствующую найденной величине зоны. Умножением полученной концентрации на степень разведения получают активность в 1 мл основного раствора или в 1 мг испытуемого образца.

Пример. Средний размер зон для раствора испытуемого образца при разведении 1:300 составляет 18,7 мм, средний размер зон для раствора стандартного образца, содержащего 2 мкг/мл (контрольная концентрация) из тех же чашек, – 18,5 мм. Следовательно, разность составляет +0,2 мм. Эту разность прибавляют к величине зоны для раствора в концентрации 2 мкг/мл по стандартной кривой, которая равна D_3 = 18,6 мм, и получают величину 18,8 мм. Находят на кривой концентрацию, соответствующую данному размеру зоны — 2,36 мкг/мл. Эту величину умножают на степень разведения и получают содержание активного вещества в 1 мл основного раствора, т. е. 2,36 мкг/мл × 300= 708 мкг/мг.

Так как концентрация основного раствора составляла 1 мг/мл, то активность испытуемого образца равна 708 мкг/мл: 1 мг/мл = 708 мкг/мл.

Определение активности испытуемого образца расчетным путем.

Кривая, отражающая зависимость между активностью антибиотика и размером зоны угнетения роста тест–микроба, после перехода к координатам «логарифм концентрации (lg C) – диаметр зоны (D)» преобразуется в прямую, уравнение которой:

$$D = a + b \cdot \lg C,$$

где a – свободный член;

b – угловой коэффициент.

По исправленным значениям величин диаметров зон d_1; d_2; d_4; d_5 для растворов стандартного образца с концентрациями C_1; C_2; C_4; C_5 и общей средней величине диаметра зоны d_3, соответствующей контрольной C_3, рассчитывают величины a и b с применением метода наименьших квадратов. Так как концентрации C_1; C_2; C_3; C_4; C_5 составляют геометрическую прогрессию, формулы для вычисления коэффициентов a и b могут быть записаны в виде:

$$\bar{b} = (-2d_1 - d_2 + d_4 + 2d_5)/10 \cdot \lg Z;$$

$$a = \bar{d} - \bar{b} \cdot \lg C_3,$$

где Z — знаменатель прогрессии разведения;

$$\bar{d} = (d_1 + d_2 + d_3 + d_4 + d_5)/5.$$

Пример. Пусть знаменатель прогрессии разведения Z = 1,25, C_3 = 5,0, а средние значения диаметров зон (в мм) равны: d_1 = 17,64; d_2= 18,15; d_3 = 19,03; d_4 = 19,58; d_5 = 20,09.

Тогда:

$$\bar{b} = (-2 \cdot 17{,}64 - 18{,}15 + 19{,}58 + 2 \cdot 20{,}09) / (10 \cdot \lg 1{,}25) = 6{,}33 : 0{,}969 = 6{,}532.$$

$$\bar{d} = (17{,}64 + 18{,}15 + 19{,}03 + 19{,}58 + 20{,}09) / 5 = 18{,}90;$$

$$a = 18{,}90 - 6{,}532 \cdot 0{,}6990 = 14{,}33.$$

Если в опыте с одной стандартной кривой проведено n испытаний образца, то логарифм среднего значения концентрации испытуемого образца в

опыте рассчитывают по формуле:

$$\lg C_U = \lg C_3 + (\overline{d}_u - \overline{d}_s) : b,$$

где C_U — среднее значение рабочей концентрации испытуемого образца, полученное по n испытаниям;

$\overline{d}_u$ – среднее значение диаметра зон задержки роста, полученное по n параллельным испытаниям ($3n$ чашкам);

$\overline{d}_s$ — среднее значение соответствующего диаметра для контрольной концентрации, полученное в тех же испытаниях (по $3n$ чашки).

Величину концентрации C_U вычисляют как антилогарифм: C_U = antilg ($\lg C_U$).

Для получения активности испытуемого образца (A_u) величину C_U умножают на его разведение в опыте — γ_u.

Пример 1. Пусть $n = 1$; $C_3 = 5{,}0$; $d_s = 18{,}61$ и $d_u = 18{,}44$ при $\gamma_u = 160$.

Тогда: $\bar{d}_u = d_u = 18{,}44$; $\bar{d}_s = d_s = 18{,}61$ и $\lg C_U = 0{,}6990 + (18{,}44 — 18{,}61) : 6{,}532 = 0{,}6730$; C_U = antilg (0,6730) = 4,710; $A_u = 4{,}710 \cdot 160 = 754$.

Пример 2. Пусть $n = 3$; $C_3 = 5{,}0$; $d_{s_1} = 18{,}61$; $d_{s_2} = 18{,}3$; $d_{s_3} = 18{,}12$;

$d_{u_1} = 18{,}44$; $d_{u_2} = 18{,}1$; $d_{u_3} = 18{,}3$ при $\gamma_u = 160$.

Тогда: $\bar{d}_s = (18{,}61 + 18{,}3 + 18{,}12) : 3 = 18{,}34$;

$$\bar{d}_u = (18{,}44 + 18{,}1 + 18{,}3) : 3 = 18{,}28;$$

$$\lg C_U = 0{,}6990 + (18{,}28 — 18{,}34) : 6{,}532 = 0{,}6990 — 0{,}0092 = 0{,}6898;$$

$$C_U = \text{antilg}\ (0{,}6898) = 4{,}896;$$

$$A_u = 4{,}896 \cdot 160 = 783.$$

Поскольку микробиологическое исследование активности антибиотиков подвержено вариабельности, следует проводить не менее 6 повторных испытаний в разные дни (не менее 2 дней), так как средняя активность от-

дельных определений, проведенных в разные дни, – более надежная величина, чем средняя активность, полученная в результате такого же количества определений, проведенных одновременно.

Расчет ошибки определения логарифма концентрации испытуемого образца в пределах одного опыта приведен в приложении 1 к настоящей статье. Объединение результатов отдельных опытов проводят в соответствии с формулами, приведенными в приложении 2.

Во всех сомнительных случаях и при определении активности стандартных образцов должен использоваться только трехдозный вариант метода диффузии в агар.

Для определения содержания активного вещества во флаконе активность, найденную в 1 мг, умножают на массу содержимого флакона, выраженную в миллиграммах. При исследовании раствора, приготовленного из всего содержимого флакона или ампулы, активность, найденную в 1 мл этого раствора, умножают на его объем. В случае необходимости определения содержания активного вещества в 1 мг испытуемого образца следует величину, характеризующую содержание активного вещества во флаконе, разделить на массу содержимого флакона, выраженную в миллиграммах.

При определении содержания активного вещества в таблетках или капсулах их количество, а также подготовка для анализа должны соответствовать требованиям общей фармакопейной статьи на данные лекарственные формы. В дальнейшем основной раствор испытуемого образца готовят из расчета 1 мг в 1 мл. После перемешивания раствору дают отстояться или центрифугируют. Рабочий раствор испытуемого образца готовят разведением надосадочной жидкости основного раствора. Для определения содержания активного вещества в 1 таблетке или капсуле активность 1 мг порошка растертых таблеток или содержимого капсул умножают на среднюю массу таблетки или содержимого капсулы, выраженную в миллиграммах.

При исследовании таблеток, покрытых оболочкой, активность опреде-

ляют в нескольких растворенных таблетках, количество которых и растворитель должны быть указаны в фармакопейной статье. Активность, найденную в 1 мл основного раствора, умножают на его объем и делят на количество растворенных в этом объеме таблеток.

Выращивание и хранение культур тест–микроорганизмов. Все культуры тест–штаммов микроорганизмов сохраняют в запаянных пробирках на соответствующих плотных питательных средах в течение 15–30 сут при температуре от 4 до 10°С, после чего пересевают на свежую питательную среду. Тест–микробы можно сохранять и в лиофилизированном состоянии.

Для характеристики культурных свойств микроорганизмов (табл. 1) производится их высев в пробирки с –МПБ, затем через 18–20 ч инкубации при температуре (36 ± 1) °С культуры высевают на чашки Петри с плотной средой для выделения типичных колоний, которые после этого пересевают на соответствующие питательные среды для получения в дальнейшем взвесей вегетативных клеток или спор. Взвесь хранят в запаянных стеклянных пробирках при температуре от 4 до 10°С в течение определенного срока.

В полученной взвеси определяют концентрацию клеток (спор) по оптическому стандарту мутности или нефелометрически (основная взвесь). Из этой взвеси по мере надобности готовят рабочую суспензию в соответствии с посевной дозой, предусмотренной для каждого тест–микроба.

Культуру тест–микроорганизма *Staphylococcus aureus* 209Р высевают на чашки Петри со средой № 1 и после выращивания в течение 18–20 ч при температуре (36 ± 1) °С оставляют при комнатной температуре на 24 ч для наблюдения за образованием пигмента. Отбирают типичные колонии и пересевают их в пробирки со скошенным агаром того же состава.

Для определения антимикробной активности используют взвесь 18–20 ч культуры стафилококка, выращенной в пробирке на скошенном агаре. Возможно также применение в течение длительного времени взвеси культуры, полученной следующим образом: культуру выращивают в течение 18–20 ч на

скошенном агаре в пробирке, смывают ее 5–10 мл стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида. Полученной взвесью засевают матрац с 300 мл среды №1 (со скошенной поверхностью), выращивают в течение 2 сут (1 сут при (36±1)°С и 1сут при комнатной температуре), смывают с помощью примерно 50 мл стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида. Взвесь культуры можно хранить в запаянных пробирках в течение 5–7 нед при температуре от 4 до 10 °С.

Культуру тест–микроорганизма *Bordetella bronchiseptica* (АТСС 4617, гладкая форма) выращивают так же, как указано для *S. aureus* 209Р, за исключением времени инкубации, которое составляет для *B. bronchiseptica* 30–36 ч. Посевным материалом служит культура, выращенная в пробирках со скошенным агаром и хранящаяся при температуре от 4 до 10 °С не более 2 нед. Для длительного применения взвеси клеток культуру смывают с питательной среды 5–10 мл стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида, засевают матрац со средой № 1 (со скошенной поверхностью) и далее поступают так же, как при подготовке культуры *S. aureus* 209Р. Взвесь клеток *B. bronchiseptica* АТСС 4617 может храниться в течение 7 сут.

Культуру тест–микроорганизма *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 2134 выращивают на чашках Петри со средой № 1 в течение 18–20 ч при температуре (36 ± 1) °С, отбирают типичные колонии, пересевают их на МПБ с pH от 7,2 до 7,4 и выращивают в вышеуказанных условиях. Полученная культура служит посевным материалом для приготовления суточной культуры, используемой при определении активности в каждом конкретном опыте, и может храниться в течение 30 сут при температуре от 4 до 10 °С.

Культуру тест–микроорганизма *Candida utilis РКПУ 1270/ЛИА–01* выращивают на чашках Петри со средой №3 в течение 48 ч при температуре (30 ± 1) °С, отбирают типичные колонии, пересевают их в пробирки со скошенным агаром того же состава и выращивают в указанных выше условиях. Полученная культура служит посевным материалом для приготовления взвеси клеток,

применяемой в течение длительного времени. Для этого культуру с поверхности среды смывают 5–10 мл стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида и засевают матрац с 300 мл среды № 3 (со скошенной поверхностью). Через 2 сут культуру смывают 50 мл стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида. По мере надобности готовят рабочую взвесь, густота которой должна быть такой, чтобы при разведении ее в 30 раз 0,9 % раствором натрия хлорида оптическая плотность составляла 0,22—0,23. Для определения густоты взвеси используют нефелометр с нейтральным светофильтром и кюветы с толщиной слоя 3 мм. Рабочая взвесь может храниться в течение 30 сут.

При использовании спорообразующих культур тест–микроорганизмов процесс выращивания на чашках Петри, отбор типичных колоний, пересев в пробирки со скошенным агаром и в матрацы осуществляют так же, как указано для *S. aureus* 209Р.

Для выращивания культур тест–микрооганизмов *Bacillus subtilis*, var. $Л_2$ и *B. pumilus* N СТС 8241 на чашках Петри и в пробирках используют среду №1, при выращивании в матрацах – среду №4. Для культивирования тест–микроорганизмов *B. cereus*, var. *mycoides* НВ и *B. subtilis* АТСС 6633 на чашках Петри и в пробирках используют среду № 1, при выращивании в матрацах – среду № 5. Для выращивания культуры тест–микроба *B. cereus*, var. *mycoides* 537 на чашках Петри и в пробирках используют среду № 2, а в матрацах – среду № 4.

Для получения взвеси спор культуру, выращенную в пробирках, смывают 5–10 мл стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида, засевают ею несколько матрацев с 300 мл питательной среды (со скошенной поверхностью) и выращивают в течение 5–7 сут. В процессе выращивания периодически производят микроскопический контроль культуры, и если в мазках, окрашенных по Граму, имеется в поле зрения 80–90 % спор, производят смыв стерильной водой очищенной.

Полученную взвесь спор прогревают при температуре от 60 до 70 °С в

течение 30 мин. Затем промывают стерильной водой очищенной при центрифугировании до полной прозрачности надосадочной жидкости. Промытую взвесь вновь прогревают в течение 30 мин при температуре от 60 до 70 °С. Взвесь спор хранят в запаянных стеклянных пробирках при температуре от 4 до 10 °С и используют до тех пор, пока интенсивность роста и четкость зон при определении антимикробной активности препаратов удовлетворяют предъявляемым требованиям.

Для заражения питательных сред допускается использование лиофилизированных тест–микроорганизмов с точно известным содержанием количества микробных клеток (спор) в ампуле, которые после восстановления в соответствующем растворителе (0,9 % растворе натрия хлорида или воде очищенной) вносят в питательную среду без предварительного пересева.

Питательные среды и буферные растворы. В табл.3 представлен состав сред, используемых при определении активности антибиотиков.

Для приготовления сред № 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 13, 14, 15, 16 применяют ферментативный гидролизат биомассы микроорганизмов без оболочек. Методика приготовления состоит в следующем: 5 г сухого ферментативного гидролизата размешивают в 1 л воды дистиллированной, прибавляют агар–агар. В случае необходимости в среду прибавляют соли в количестве, указанном в прописи; pH сред определяют потенциометрическим методом со стеклянными электродами или колориметрически. Устанавливают pH хлористоводородной кислотой или раствором натрия гидроксида.

Таблица 3 – **Состав питательных сред для выращивания тест–микроорганизмов, получения спор и определения активности антибиотиков**

Ингредиенты	Среда №																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Содержание каждого ингредиента																		
М–ПБ (1:2)	1000 мл	1000 мл	1000 мл	5 г	5 г	5 г												
Ферментативный гидролизат биомассы микроорганизмов без оболочек							5 г	5 г	5 г	5 г			5 г	5 г	5 г			5 г
Агар–агар	20 г	20 г	17 г	25 г	25 г	10–15 г	10–12 г	10–12 г	15 г	10–15 г	15–20 г	15–20 г	20 г	15 г	15 г	18–20 г	18 г	15—20 г
Глюкоза			10 г														5 г	5 г
Натрия фосфат двузамещенный							3 г	3 г	3 г		3 г	3 г				5 г	15 г	
Калия фосфат однозамещенный										25 г					25 г			
Натрия хлорид			5 г													20 г		30 г
Калия хлорид													20 г			20 г		

Мочевина																	2 г	
Аммония цитрат двузамещенный																5 г		
Аммония хлорид																	2г	
Вода очищенная				(*)	(*)	(*)	(*)	(*)	(*)	(*)	(*)	(*)	(*)	(*)	(*)	(*)	(*)	(*)
pH после стерилизации	7,0–7,2	7,8–8,0	7,0–7,2	6,0–6,2	7,8–8,0	6,8–7,0	6,8–7,0	7,8–8,0	7,8–8,0	6,0–6,2	6,8–7,0	7,8–8,0	7,0–7,2	7,8–8,0	7,0–7,2	5,8–6,0	7,8–8,0	6,8–7,0

(*)1000 мл

Готовые среды разливают в соответствующую посуду и стерилизуют в автоклаве при 0,1 МПа и температуре (120±1) ºС в течение 15 мин.

М–ПБ (среда №1) готовят на водопроводной воде обычным способом, изложенным в руководствах по микробиологии.

Примечания

1. Количество агар–агара в средах указано для цилиндрочашечной модификации. В случае применения лунок количество агар–агара увеличивают до 20—25 г на 1000 мл среды.

2. Допускается уменьшение или увеличение содержания агар–агара в средах в зависимости от его качества.

3. Допускается использование взамен сред с ферментативным гидролизатом биомассы микроорганизмов (без оболочек) сред с другими источниками аминного азота:

а) сухих сред на основе сухого рыбного бульона. При использовании данной среды в отдельных случаях необходимо изменение посевной дозы тест–микроба и увеличение концентрации растворов стандартных и испытуемых образцов;

б) сред на основе панкреатического гидролизата мяса (по Хоттингеру) глубокого расщепления. Среды №6, 7, 8, 10 должны содержать 130–140 мг% аминного азота, а среды № 4, 5, 9, 13–30–35 мг% аминного азота. Для приготовления сред с гидролизатом мяса применяют дистиллированную воду. Панкреатический гидролизат мяса и среды на его основе готовят обычным способом, изложенным в руководствах по микробиологии. Условия проведения анализа на средах с панкреатическим гидролизатом не отличаются от условий проведения анализа на средах с ферментативным гидролизатом биомассы микроорганизмов без оболочек.

При контроле активности антибиотиков применяются буферные растворы, состав которых приведен в табл. 4.

Таблица 4 – **Состав буферных растворов**

Ингредиенты буферов	Содержание ингредиентов в буферном растворе				
	№ 1	№2	№3	№4	№5
Калия фосфат однозамещенный, г	3,63	—	7,72	0,68	32
Калия фосфат двузамещенный, г		—	—		8
Натрия фосфат двузамещенный, г	7,13	—	1,78	10,99	—
Натрия цитрат трехзамещенный, г	—	20,6	—	—	
Хлористоводородная кислота концентрированная, г	—	1,81	—	—	
Вода очищенная, до 1000 мл	1000 мл	1000 мл	1000 мл	1000 мл	1000 мл
pH буфера	6,8–7,0	5,8–6,0	6,0–6,2	7,8–8,0	6,0–6,2

Приложение 1

Вычисление ошибки логарифма активности испытуемого $S_{\lg Cu}$ проводится по ОФС «Статистическая обработка результатов определения специфической фармакологической активности лекарственных средств биологическими методами».

Сначала вычисляют величину дисперсии S_0^2, характеризующую разброс значений d_1, d_2, d_3, d_4, d_5 относительно прямой $D = a + b \lg C$:

$$S_0^2 = \left(\sum_{i=1}^{5}(d_i - (a + b \lg C_i))^2\right)/:3,$$

$$S_{\lg C_U} = \sqrt{\frac{S_0^2}{b^2}\left(0{,}2 + \frac{1}{n} + \frac{5\,(\bar{d}_U - \bar{d}_S^2)}{b^2\,(5\sum_{i=1}^{5}\lg^2 C_i - \sum_{i=1}^{5}C_i)^2}\right)},$$

где n — число параллельных испытаний величины C_u, приведенных в опыте с одной стандартной кривой;

d_u — среднее значение диаметра зон задержки роста для испытуемого, полученное по n испытаниям;

d_s — среднее значение диаметра зон задержки роста для контрольной концентрации, полученное по тем же n испытаниям.

Число степеней свободы величины $S_{\lg Cu}$ равно 3.

Пример. Вычислим $S_{\lg Cu}$ с использованием данных примера, приведенного в основном тексте статьи для иллюстрации вычисления параметров стандартной кривой.

Расчеты S_0^2 удобно проводить с помощью следующей табл. 5.

Таблица 5 — Сводная таблица данных для расчета дисперсии S_0^2

C_i,	lg C_i	d_i	$a + b \lg C_i$,	$[d_i - (a + b \times \lg C_i)]^2$	$\mathrm{Ig}^2 C_i$
3,2	0,5051	17,64	17,63	0,0001	0,2551
4,00	0,6021	18,15	18,26	0,0121	0,3625
5,00	0,6990	19,03	18,90	0,0169	0,4886
6,25	0,7959	19,58	19,53	0,0025	0,6334
7,8	0,8921	20,09	20,16	0,0049	0,7958
Суммы по столбцам	3,4942			0,0365	2,5354

При вычислении значений $a + b \lg C_i$ необходимо брать достаточное число знаков для a и b.

Пусть число испытаний образца в опыте $n = 1$, $d_s = 18{,}61$ и $d_u = 18{,}44$. Тогда $\bar{d}_s = d_s = 18{,}61$; $d_u = d_u = 18{,}44$. Найдем $S_{\lg Cu}$:

$$S_0^2 = 0{,}0365 : 3 = 0{,}01217$$

$$S_{\lg c_U} = \sqrt{\frac{0{,}01217}{6{,}532^2}\left(0{,}2 + 1 + \frac{5\,(18{,}44 - 18{,}61)}{6{,}532^2\,(5 \cdot 2{,}5355 - 3{,}4943)^2}\right)}$$

Приложение 2

Объединение результатов *n* опытов, выполненных с одним и тем же разведением образца γ_U, проводится с усреднением значений логарифмов активностей испытуемого с учетом ошибок их определения в каждом опыте по формуле:

$$\lg \bar{C}_U = (\sum_{j=1}^{N} g_j \lg C_{U_j}) / : \sum_{j=1}^{N} g_j,$$

где $g_i = 1 : S^2 \lg C_{Uj}$.

Ошибка определения величины $\lg \bar{C}_U$ при этом будет равна:

$$S \lg \bar{C}_U = 1 / \sqrt{\sum_{j=1}^{N} g_j}$$

Доверительный интервал для величины логарифма истинной активности записывается с учетом значения критерия Стьюдента, взятого из таблиц для доверительной вероятности $P = 0{,}95$ и числа степеней свободы $f = \sum_{j=1}^{N} f_j$,где

f_j – число степеней свободы величины $S \lg C_{Uj}$:

$$\lg \bar{C}_U \pm t(P,f) \cdot S \lg \bar{C}_U$$

Пример. Проведены 2 опыта по определению активности препарата. Разведение испытуемого $\gamma_U = 200$. В первом опыте 2 испытания дали следующие результаты:

$$\lg G_1 = 0{,}6221; \text{ при } S_{\lg C1} = 0{,}0170 \text{ при } f_1 = 3$$

Во втором опыте по 4 испытаниям имели:

$$\lg C_2 = 0{,}6305; S_{\lg C2} = 0{,}0099 \text{ при } f_2 = 3$$

Для объединения результатов проводят следующие вычисления:

$g_1 = 1 : 0{,}017^2 = 3460$;

$g_1 = 1 : 0{,}0099^2 = 10203$;

$g_1 + g_2 = 13663$;

$\lg \bar{C}_U = (3460 \cdot 0{,}6221 + 10203 \cdot 0{,}6305) : 13663 = 0{,}6284$;

$$S \lg C_U = 1 : \sqrt{13663} = 0{,}0086$$

Границы доверительного интервала для логарифма истинной активности образца получают с использованием величины t (0,95; 6) = 2,45:

$$0{,}6284 \pm 2{,}45 \cdot 0{,}0086 = 0{,}6284 \pm 0{,}0211.$$

Таким образом, нижняя граница 0,6073, верхняя граница 0,6495.

Потенцируя, найдем среднее значение и границы доверительного интервала для истинной активности основного рабочего раствора испытуемого: 4,250; 4,049; 4,462. Учет степени разведения при получении основного рабочего раствора позволяет получить среднее значение, а также нижнюю и верхнюю границу несимметричного доверительного интервала для истинной активности испытуемого: 850; 810; 892.

Точность определения должна быть такова, чтобы доверительные границы при P = 95 % отклонялись от среднего значения не более чем на ± 5 %. В данном случае, используя верхнюю границу доверительного интервала, имеем:

$$\frac{892 - 850}{850} \cdot 100\,\% = \frac{42}{850} \cdot 100\,\% = 4{,}94\,\% < 5\,\%.$$

Определение эффективности антимикробных консервантов **ОФС.1.2.4.0011.15**

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на метод определения эффективности антимикробных консервантов, входящих в состав лекарственных препаратов (ЛП).

Антимикробные консерванты – это вещества органической или неорганической природы, обладающие антимикробным действием, которые добавляют в ЛП для предотвращения роста и развития микроорганизмов, которые могут попасть в них в процессе производства или при многократном применении. Эффективная концентрация консерванта в готовом ЛП должна быть ниже дозы, токсичной для человека.

Эффективность антимикробных консервантов – это способность вещества ингибировать рост микроорганизмов в ЛП на протяжении срока годности. Испытание эффективности консервантов – это процедура, состоящая из искусственной контаминации образца ЛП суспензиями определенных тест-микроорганизмов, инкубации контаминированных образцов при определенной температуре, отбора проб через указанные интервалы времени и подсчете жизнеспособных клеток микроорганизмов в 1г (мл) ЛП на протяжении периода испытания, расчетов и оценке полученных результатов.

ЛП, в состав которых входят консерванты, разделены на три категории, представленные в табл. 1.

Таблица 1 – Категории ЛП, содержащие консерванты

Категория	Лекарственные препараты
1	Стерильные ЛП (парентеральные; препараты для местного применения, офтальмологические ЛП)
2	Нестерильные ЛП, применяемые местно, для введения в полость носа, в том числе и на слизистые оболочки
3	ЛП для приема внутрь, включая антацидные, водорастворимые или приготовленные на водной основе

Недопустимо вносить консерванты в ЛП для внутриполостных, внутрисердечных, внутриглазных инъекций, имеющих доступ к спинномозговой жидкости, а также при разовой дозе, превышающей 15 мл.

1. Используемые тест-штаммы микроорганизмов и работа с ними

Эффективность консервантов определяют в отношении определенных видов бактерий и дрожжевых и плесневых грибов:

Escherichia coli ГКМП 240533, ATCC 25922, ATCC 8739, NCTC 12923, NCTC 12241, DSM 1103, CIP 53.126, NCIMB 8545,

Pseudomonas aeruginosa ГКМП 190155, ATCC 9027, NCTC 12924, CIP 82.118, NCIMB 8626,

Staphylococcus aureus ГКМП 201108, ATCC 6538, NCTC 10788, NCIMB 9518, CIP 4.83,

Candida albicans ГКМП 303903, ГКМП 303901, ATCC 10231, РКПГУ 401/NCTC 885-653, NCPF 3179, IP 48.72,

Aspergillus brasiliensis ВКМ F-3882, ATCC 16404, ВКМ F-1119, ATCC 9642, РКПГF 106, NCPF 2275, IMI 149007, IP1431.83.

Примечания.

1. Кроме перечисленных тест-штаммов можно использовать и другие микроорганизмы, которые должны быть типичными по культурально-морфологическим, тинкториальным и биохимическим свойствам.
2. Набор тест-штаммов микроорганизмов может быть уменьшен или увеличен в зависимости от способа применения или состава испытуемого ЛП. Например, для испытания лекарственных препаратов для приема внутрь, содержащих высокие концентрации сахара, можно использовать *Zygosaccharomyces rouxii* (NCYC 381; IP 2021.92), для препаратов, в состав которых входит бензалкония хлорид, целесообразно включать *Burkholderia cepacia* (ATCC 25416, ATCC 177759) и др.

Все тест-штаммы микроорганизмов, полученные из Государственных коллекций с сертификатом производителя в ампулах, на дисках или в другом виде следует восстанавливать способами, описанными в прилагаемых к тест-штаммам инструкциях или в соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота». Культуры бактерий и грибов пересевают, делая не более 5 пассажей. Условия культивирования тест-штаммов для приготовления инокулята представлены в табл. 2. Используемые питательные среды представлены в ОФС «Микробиологическая чистота».

Таблица 2 – Условия культивирования тест-микроорганизмов для приготовления инокулята

Тест-штамм	Питательная среда	Условия инкубации посевов	
		температура	время
- *Escherichia coli* - *Pseudomonas aeruginosa* - *Staphylococcus aureus*	Соево-казеиновый агар или среда № 1 Соево-казеиновый бульон или среда № 8	32,5 ± 2,5 °С	18 – 24 ч
- *Candida albicans*	Агар Сабуро с глюкозой или среда № 2, жидкая среда Сабуро или соево-казеиновый бульон	22,5 ± 2,5 °С	48 ч
-*Aspergillus brasiliensis*	Агар Сабуро с глюкозой или среда № 2	22,5 ± 2,5 °С	6 – 10 сут
Примечание. Допускается использование альтернативных жидких и агаризованных питательных сред отечественного и зарубежного производства			

Контроль ростовых свойств используемых питательных сред проводят в соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота».

При приготовлении инокулята суточные культуры тест-штаммов бактерий и *C.albicans* смывают с поверхности скошенного агара стерильным

0,9 % раствором натрия хлорида. Концентрацию клеток бактерий доводят до 10^9 КОЕ/мл, а *C.albicans* – до 10^7 КОЕ/мл, используя стандартный образец мутности или инструментальные методы, в том числе турбидиметрический.

В случае использования жидких питательных сред для культивирования тест-штаммов, клетки бактерий и *C.albicans* выделяют центрифугированием, промывают и ресуспендируют стерильным 0,9 % раствором натрия хлорида до концентрации $1 \cdot 10^7 – 1 \cdot 10^8$ КОЕ/мл.

Для смыва конидий *A.brasiliensis* используют стерильный 0,9 % раствор натрия хлорида, содержащий 0,05 % раствор твина-80. Количество конидий *A. brasiliensis* в 1 мл смыва определяют с помощью камеры Горяева или чашечным агаровым методом. Полученную взвесь разводят до концентрации 10^7 конидий в 1мл.

Стандартизованные суспензии всех тест-штаммов микроорганизмов разводят до концентрации $10^7 – 10^8$ КОЕ/мл.

2. Методика испытания

Для определения эффективности консервантов используют готовые ЛП в неповрежденной упаковке.

В каждый стерильный флакон с исследуемым препаратом вносят суспензию, содержащую один из тест-штаммов микроорганизмов, обеспечивая концентрацию клеток $10^5 – 10^6$ КОЕ в 1 мл или 1 г ЛП, и перемешивают. Объем инокулята должен составлять 0,5 – 1 % от объема образца.

Образцы ЛП на твердой мазевой основе нагревают до температуры (42,5 ± 2,5) °С. Смешивают инокулят каждой стандартизованной микробной суспензии с образцом ЛП в течение не менее 1 мин до достижения гомогенной эмульсии. Для улучшения смешивания можно добавить определенное (валидированное) количество стерильного поверхностно-активного вещества, например, твина-80, если оно не влияет на жизнеспособность микроорганизмов или на эффективность консерванта.

Фактическую исходную концентрацию бактерий и грибов в контаминированных образцах определяют сразу после контаминации. Для

этого чашечным агаровым методом делают посев на соответствующие питательные среды (табл. 2), используя подходящие разведения для получения на чашке от 30 до 300 колоний бактерий и от 10 до 100 колоний грибов. Для этой цели также можно применять метод мембранной фильтрации (при условии растворимости ЛП в водных растворителях или изопропилмиристате). Контаминированные образцы ЛП выдерживают при температуре (22,5 ± 2,5) °С в защищенном от света месте в течение определенного времени. Через 7, 14, 28 сут после инокуляции образцов препаратов 1 категории и через 14, 28 сут препаратов 2 и 3 категорий определяют количество жизнеспособных микроорганизмов в 1 мл образца, делая высев на чашки Петри глубинным или модифицированным глубинным методами в соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота».

Антимикробное действие ЛП устраняют одним из способов: разведением, мембранной фильтрацией или с помощью инактиватора, который вносят в чашки с питательной средой или в соответствующее разведение лекарственного средства перед посевом. Используемые инактиваторы, некоторые из которых указаны в ОФС «Микробиологическая чистота», не должны влиять на жизнеспособность микроорганизмов.

3. Результаты испытания и их интерпретация

Чашечным агаровым методом определяют количество КОЕ/мл для каждого тест-штамма через указанные выше сроки инкубации контаминированного образца ЛП. Изменение количества микробных клеток по сравнению с исходной концентрацией в 1 мл выражают в десятичных логарифмах (lg). При оценке эффективности антимикробного действия консервантов увеличение КОЕ/мл не фиксируется, если последующее измерение превышает предыдущее менее, чем 0,5 lg КОЕ.

4. Требования к качеству

Консерванты считают эффективными, если наблюдают уменьшение количества клеток бактерий в соответствии с критериями, описанными в табл. 3. Количество клеток дрожжевых и плесневых грибов не должно

увеличиваться на протяжении всего срока исследования.

Таблица 3 – Критерии оценки эффективности антимикробных консервантов ЛП

<table>
<tr><td rowspan="2">Категория ЛП</td><td colspan="3">Уменьшение количества клеток бактерий, lg</td><td colspan="3">Уменьшение количества клеток дрожжевых и плесневых грибов, lg</td></tr>
<tr><td>7 сут.</td><td>14 сут.</td><td>28 сут.</td><td>7 сут.</td><td>14 сут.</td><td>28 сут.</td></tr>
<tr><td>1</td><td>Не менее 1</td><td>Не менее 3</td><td rowspan="3">Не должно быть увеличения*</td><td colspan="3">Не должно быть увеличения*</td></tr>
<tr><td>2</td><td>-</td><td>Не менее 2</td><td>-</td><td colspan="2">Не должно быть увеличения*</td></tr>
<tr><td>3</td><td>-</td><td>Не менее 1</td><td>-</td><td colspan="2">Не должно быть увеличения*</td></tr>
<tr><td colspan="7">Примечание. * Не должно быть увеличения количества клеток бактерий, дрожжевых и плесневых грибов по сравнению с предыдущим результатом</td></tr>
</table>

Определение содержания витаминов в многокомпонентных лекарственных препаратах микробиологическим методом	**ОФС.1.2.4.0012.15** **Вводится впервые**

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на метод микробиологического определения количественного содержания витаминов в многокомпонентных лекарственных препаратах. Его осуществляют чашечным или пробирочным методами с использованием указанных ниже тест-штаммов микроорганизмов.

Определение количественного содержания витаминов чашечным методом

Тест-штаммы микроорганизмов. Для определения содержания цианокобаламина ($C_{63}H_{88}CoN_{14}O_{14}P$) используют штамм *Escherichia coli* 113-3 (АТСС 11105).

Выполнение испытания

Точную навеску порошка растертых драже или таблеток испытуемого препарата, указанную в соответствующих фармакопейных статьях, количественно переносят в мерную колбу определенной вместимости, доводят объем раствора водой очищенной до метки, перемешивают и фильтруют. Из полученного раствора готовят разведение 1 % раствором натрия цитрата[a)] так, чтобы концентрация раствора для испытания была

близкой к контрольной концентрации раствора стандартного образца (СО) цианокобаламина – 0,05 мкг/мл.

В чашки Петри (6 чашек для построения стандартной кривой и 3 чашки для раствора испытуемого препарата) одинакового диаметра с ровным и плоским дном, установленные на строго горизонтальной поверхности (регулируют по ватерпасу), разливают по 10–12 мл расплавленной и охлажденной до температуры 48 – 50 °С основной среды, засеянной суспензией *Escherichia coli* 113-3 из расчета от 4 до 6 мл суспензии на 200 мл основной среды. После застывания среды в каждой чашке стерильным бором по трафарету делают лунки в агаре: 6 лунок диаметром 8 мм под углом 60 ° друг к другу.

В 3 лунки (через одну) каждой из 6 чашек, используемых для построения стандартной кривой, и 3 чашек – для раствора испытуемого препарата, вносят по 0,1 мл раствора СО контрольной концентрации (0,05 мкг/мл). В 3 лунки (через одну) каждой из 3 чашек препарата вносят по 0,1 мл одной из концентраций остальных растворов СО, а также раствора испытуемого препарата. Чашки инкубируют при температуре 37 °С в течение 16 – 18 ч.

По окончании инкубации измеряют диаметры зон стимуляции роста тест-микроорганизма для каждой концентрации растворов СО. После измерения зон роста для всех концентраций рассчитывают среднюю величину зоны, учитывая в каждом случае 3 чашки, т. е. 9 зон. Затем рассчитывают среднюю величину зоны для контрольной концентрации, учитывая все чашки (27 зон).

По разности между средней величиной зоны контрольной концентрации раствора (0,05 мкг/мл), рассчитанной из всех чашек, и средней величиной зоны контрольной концентрации раствора СО, полученной из 3 чашек с каждой отдельной концентрацией, находят поправку к величине зоны данной концентрации. Найденную поправку прибавляют к средней величине зоны данной концентрации, если она положительная, и вычитают,

если она отрицательная. Аналогичным образом делают поправку к концентрации раствора испытуемого препарата.

Содержание цианокобаламина в 1 драже или 1 таблетке в граммах (*X*) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{C \cdot б \cdot K}{a \cdot 10^6}$$

где: *C* – содержание цианокобаламина в 1 мл испытуемого раствора, найденное по стандартной кривой, мкг;

K – коэффициент разведения;

a – навеска препарата в граммах или количество таблеток;

б – средняя масса одной таблетки, г;

10^6 – коэффициент для пересчета в граммы.

Построение стандартной (калибровочной) кривой. По исправленным значениям величин зон стимуляции роста при добавлении приготовленных концентраций и средней величине зоны контрольной концентрации на всех чашках строят стандартную кривую, откладывая на оси абсцисс концентрации цианокобаламина в мкг/мл, а на оси ординат соответствующие им величины диаметров зон роста. По полученным точкам строят стандартную кривую, находят концентрацию цианокобаламина в мкг/мл и вычисляют его содержание в образце.

Примечания.

1.Приготовление основного раствора СО цианокобаламина 100 мкг/мл. В мерной колбе вместимостью 250 мл в 25 % спирте растворяют 0,0250 г СО цианокобаламина (в пересчете на сухое вещество), доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают. Раствор годен к использованию в течение 2 мес при температуре 2 – 8 °С во флаконе темного стекла с притертой пробкой.

2. Приготовление рабочего раствора СО цианокобаламина 1 мкг/мл. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 1,0 мл основного раствора СО цианокобаламина и доводят объем раствора водой очищенной до метки. Раствор годен в течение 5 сут при температуре 2 – 8 °С.

Растворы, содержащие цианокобаламин, не должны подвергаться воздействию прямых солнечных лучей.

Из рабочего раствора СО цианокобаламина в день исследования готовят растворы, содержащие 0,025; 0,050 и 0,075 мкг цианокобаламина в 1 мл. Для этого соответственно 2,5; 5,0 и 7,5 мл рабочего раствора СО помещают в мерные колбы вместимостью 100 мл, доводят объемы растворов в колбах 1 % раствором натрия цитрата до метки и перемешивают.

Раствор, содержащий 0,05 мкг цианокобаламина в 1 мл, принимают за раствор СО контрольной концентрации.

3. Хранение и подготовка тест-культуры для анализа. Культуру тест-микроорганизма выращивают на скошенной агаризованной среде при температуре (32,5 ± 2,5) ^{o}C в течение 16–18 ч. Тест-культуру хранят при температуре 2 – 8 ^{o}C, пересевая не реже одного раза в месяц.

Состав среды для хранения тест-микроорганизма:

- казеиновый кислотный гидролизат 10 % 6 мл[б)]
- калия фосфат двузамещенный 0,02 г
- железа сульфат 0,0005 г
- магния сульфат 0,02 г
- L-аспарагин 0,02 г
- глицерин 0,2 г
- агар микробиологический 1,5 г
- цианокобаламин 10 мкг
- вода очищенная до 100 мл

pH среды до стерилизации (7,0 ± 0,2)

Приготовление среды. Ингредиенты (гидролизат казеина и соли) последовательно растворяют в воде. Аспарагин растворяют отдельно в 10 мл воды с добавлением 2 капель 1 М раствора хлористоводородной кислоты при слабом нагревании и добавляют к раствору солей. Устанавливают pH 7,0 полученной смеси 15 % раствором натрия гидроксида, после чего доводят объем среды водой очищенной до 100 мл, прибавляют 0,2 г глицерина и 1,5 г агара микробиологического. Смесь нагревают на водяной бане до полного растворения агара, затем прибавляют 10 мкг цианокобаламина.

За 1сут до проведения испытания тест-микроорганизм пересевают на пептонно-солевую среду следующего состава:

А) *Пептонно-солевая среда агаризованная*:

- пептон ферментативный сухой 2,0 г
- натрия хлорид 0,5 г
- агар микробиологический 1,8 г
- вода очищенная до 100 мл

Б) *Пептонно-солевая среда жидкая:*

- пептон ферментативный сухой 2,0 г
- натрия хлорид 0,5 г

- вода очищенная до 100 мл

pH среды до стерилизации (7,0 ± 0,2).

Приготовление сред. Жидкую и агаризованную среды разливают в пробирки по 5 мл, стерилизуют насыщенным паром под давлением в паровом стерилизаторе при температуре 120–121 °С в течение 15 мин. Для получения скошенного агара среду охлаждают в наклонном положении На обе среды делают посев тест-культуры *E. coli* из рабочего музея и инкубируют в течение 16 – 18 ч при температуре (32,5 ± 2,5) °С и используют для приготовления посевного материала.

4. Состав и приготовление основной среды.

Состав основной среды:

- аммония хлорид 2,0 г
- натрия хлорид 3,0 г
- калия фосфат двузамещенный 0,4 г
- натрия цитрат трехзамещенный 3,0 г
- лактоза 3,0 г
- агар микробиологический 15,0 г
- вода очищенная до 1000 мл

pH среды до стерилизации (7,0±0,2)

Приготовление среды. Среду разливают по 200 мл в колбы и стерилизуют насыщенным водяным паром при температуре 120 – 121 °С в течение 15мин. Хранят при температуре 2 – 8 °С не более 2 мес.

Перед розливом в чашки Петри на каждые 200 мл расплавленной среды добавляют по 5 мл стерильного 40 % раствора глюкозы. Раствор глюкозы стерилизуют при температуре 120 – 121 °С в течение 10 мин.

5. Приготовление посевного материала. Со скошенного пептонно-солевого агара (А) делают смыв суточной тест-культуры 0,9 % раствором натрия хлорида или используют бульонную культуру с жидкой питательной среды (Б). Плотность микробной взвеси должна быть $(1–2)10^9$ КОЕ/мл.

Вся работа должна выполняться в асептических условиях. В работе используют только химически чистую лабораторную посуду.

Определение содержания витаминов пробирочным методом

Пробирочный метод используют для определения количественного содержания D-биотина ($C_{10}H_{16}N_2S$), кальция пантотената ($C_{18}H_{32}CaN_2O_{10}$), фолиевой кислоты ($C_{19}H_{19}N_7O_6$), никотиновой кислоты (или никотинамида) в многокомпонентных препаратах.

Тест-штаммы микроорганизмов

- *Lactobacillus plantarum* ВКМ В-578 (АТСС 8014) используют для определения D-биотина, кальция пантотената и кислоты никотиновой (или никотинамида);

- *Enteroccocus faecalis* (*E. faecium*) ВКМ В-602 применяют для определения фолиевой кислоты.

Выполнение испытания

Точную навеску порошка растертых драже или таблеток, указанную в соответствующих фармакопейных статьях или в нормативной документации, количественно переносят водой в мерную колбу определенной вместимости, доводят объем раствора водой очищенной до метки, перемешивают и фильтруют (основной раствор).

Готовят растворы рабочих стандартных и испытуемых образцов. Для этого в 2–3 ряда пробирок одинакового размера разливают по 1 мл свежеприготовленной воды очищенной. Образцы в количестве 1 мл с концентрацией D-биотина около 0,002 мкг/мл, кальция пантотената – 0,2 мкг/мл, фолиевой кислоты – 0,004 мкг/мл, никотиновой кислоты (или никотинамида) – 0,32 мкг/мл вносят в первые пробирки соответствующих рядов и делают 6 последовательных разведений в каждом ряду, перемешивая и перенося 1мл раствора в следующие пробирки ряда; из последней отбирают 1 мл и удаляют в дезинфицирующий раствор. Затем во все пробирки добавляют по 1 мл основной среды. При этом общий объем полученных растворов в каждой пробирке должен быть равен 2 мл.

В каждом ряду ставят отрицательный контроль, содержащий 1 мл воды очищенной и 1 мл основной среды.

Все пробирки стерилизуют насыщенным паром под давлением в паровом стерилизаторе при температуре 120 – 121 ^{0}С в течение 10–15 мин. После охлаждения в каждую пробирку вносят по 0,1 мл разведенной взвеси тест-культуры (п.5).

Засеянные пробирки инкубируют при температуре (32,5±2,5)^{o}С в течение 16–24 ч. Интенсивность роста тест-культуры в пробирках

стандартного и испытуемого образцов измеряют на фотометре-нефелометре при длине волны около 540 нм.

Содержание определяемого витамина в одной таблетке в граммах (*X*) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{C \cdot б \cdot V \cdot V_1}{a \cdot V_2 \cdot 10^6}$$

где *C* – среднеарифметическое содержание D-биотина в 1 мл, найденное по стандартной кривой для шести концентраций растворов испытуемого образца с учетом всех разведений (4; 8; 16; 32; 64 и 128), в мкг;

V, V_1, V_2 – разведения, мл;

а – навеска испытуемого образца в граммах или количество таблеток;

б – средняя масса одной таблетки, г;

10^6 – коэффициент для пересчета, г.

Примечания.

Приготовление рабочих растворов СО витаминов

1. СО D-биотина. В мерную колбу вместимостью 500 мл помещают 200 мл 25 % спирта, в котором растворяют 0,0010 г D-биотина на кипящей водяной бане. После охлаждения объем раствора доводят тем же растворителем до метки (основной раствор) и перемешивают. В 1 мл основного раствора содержится 2 мкг D-биотина.

В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 5 мл основного раствора и доводят объем раствора водой очищенной до метки. Переносят 1 мл полученного раствора в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят объем раствора водой до метки (рабочий раствор). Рабочий раствор содержит 0,002 мкг D-биотина в 1 мл. Содержание D-биотина в стандартном ряду разведений должно соответствовать 0,0005; 0,00025; 0,000125; 0,0000625; 0,000031; 0,0000156 мкг/мл и 0 мкг/мл – в отрицательном контроле.

2. СО кальция пантотената. В мерной колбе вместимостью 50 мл в 25 % спирте растворяют 0,050 г кальция пантотената (в пересчете на сухое вещество по содержанию азота) и доводят объем раствора тем же растворителем до метки (основной раствор). В 1 мл основного раствора содержится 1 мг кальция пантотената.

В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 1 мл основного раствора и доводят объем раствора водой очищенной до метки. Переносят 1 мл полученного раствора в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят объем раствора водой очищенной до метки (рабочий раствор). Рабочий раствор содержит 0,2 мкг кальция пантотената в 1 мл**.** Содержание кальция

пантотената в стандартном ряду разведений должно соответствовать 0,05; 0,025; 0,0125; 0,00625; 0,0031; 0,00156 мкг/мл и 0 мкг/мл – в отрицательном контроле.

3. СО фолиевой кислоты. В мерной колбе вместимостью 100 мл в 5 мл 1 % раствора натрия двууглекислого[в)] растворяют 0,0100 г фолиевой кислоты, доводят объем водой очищенной до метки (основной раствор). В 1 мл основного раствора содержится 100 мкг фолиевой кислоты.

В мерную колбу вместимостью 100 мл вносят 1 мл основного раствора и доводят объём раствора водой очищенной до метки. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 1 мл полученного раствора, доводят объём раствора водой очищенной до метки.

10 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл (рабочий раствор). Рабочий раствор содержит 0,004 мкг фолиевой кислоты в 1 мл.

Содержание фолиевой кислоты в стандартном ряду при приготовлении разведений должно соответствовать 0,001; 0,0005; 0,00025, 0,000125; 0,0000625; 0,00003125 мкг/мл и 0 мкг/мл – в отрицательном контроле.

4. СО никотиновой кислоты (или никотинамида). В мерной колбе вместимостью 100 мл в 25 % спирте растворяют 0,0100 г никотиновой кислоты (или никотинамида) и доводят объем раствора тем же растворителем до метки (основной раствор). В 1 мл основного раствора содержится 100 мкг никотиновой кислоты или никотинамида. Раствор хранят при температуре 2 – 8 ^{0} С не более 1 мес.

В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 2 мл основного раствора и доводят объем раствора водой очищенной до метки. 4 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят объем раствора водой до метки. Рабочий раствор содержит 32 мкг/мл никотиновой кислоты или никотинамида.

Содержание кислоты никотиновой или никотинамида в стандартном ряду разведений должно соответствовать 0,08; 0,04; 0,02; 0,01; 0,005 мкг/мл и 0 мкг/мл – в отрицательном контроле.

Растворы годны к использованию в течение 2–3 мес при хранении в емкости с притертой пробкой при температуре 2 – 8 °С.

2. Построение стандартной кривой. На оси абсцисс откладывают содержание определяемого витамина (в мкг/мл) в пробирках стандартного ряда, а на оси ординат – соответствующие им значения процента светопропускания. По полученным точкам вычерчивают стандартную кривую, находят концентрацию соответствующих витаминов в мкг/мл и вычисляют их содержание в образце.

3. Хранение и подготовка тест-культуры для анализа

3.1. *L. plantarum* ВКМ В-578 (АТСС 8014) поддерживают на питательной среде следующего состава:

- дрожжевой экстракт 2,0 г

- пептон 0,5 г
- глюкоза 0,5 г
- натрия ацетат 0,5 г
- твин-80 0,01 г
- агар микробиологический 1,6 г
- вода очищенная до 100 мл

pH (6,8 ± 0,2)

3.2. *E. faecalis* ВКМ В-602 поддерживают на питательной среде следующего состава:

- дрожжевой экстракт 1,0 г
- глюкоза 0,5г
- натрия ацетат 0,5 г
- агар микробиологический 1,8 г
- вода очищенная до 100 мл

pH (6,8 ± 0,2).

Ингредиенты последовательно растворяют в воде, устанавливают требуемое значение pH 6,8 и доводят объем водой очищенной до 100 мл. Смесь нагревают при перемешивании на кипящей водяной бане до полного растворения агара, разливают по 5 мл в пробирки, стерилизуют насыщенным паром под давлением в паровом стерилизаторе при температуре 120 – 121 ^{0}C в течение 10–15 мин, охлаждают в наклонном положении для получения скошенной поверхности агара.

Посевы инкубируют при температуре (32,5 ± 2,5) ^{0}C в течение 16–24 ч. Тест-культуру хранят при температуре 2 – 8 ^{0}C, пересевая не реже одного раза в мес.

Примечания.

Состав и приготовление основной среды

1. *Состав среды для определения содержания* D-*биотина:*

- глюкоза 40 г
- натрия ацетат 20 г
- раствор гидролизата казеина 10% 100 мл*б)*
- раствор L-цистина и D, L-триптофана 100мл*г)*
- раствор твина-80 1 мл*д)*
- раствор аденина, гуанина и урацила 10 мл*е)*

- раствор кальция пантотената и тиамина 20 мл[ж)]
- раствор рибофлавина 40 мл[з)]
- раствор ПАБК, пиридоксина, никотиновой кислоты 20 мл[и)]
- растворы солей А[к)] и солей Б[л)] по 10 мл
- вода очищенная до 1000 мл

  pH (6,8 ± 0,2)

2. *Состав среды для определения содержания кальция пантотената:*

- глюкоза 40 г
- натрия ацетат 20 г
- раствор гидролизата казеина[б)] 100 мл
- раствор L-цистина и D, L-триптофана[г)] 100 мл
- раствор твина-80[д)] 1 мл
- раствор аденина, гуанина, урацила[е)] 20 мл
- раствор рибофлавина, тиамина, D-биотина[м)] 20 мл
- раствор ПАБК, пиридоксина, никотиновой кислоты[и)] 20 мл
- растворы солей А[к)] и солей Б[л)] по 20 мл
- вода очищенная до 1000 мл

  pH (6,8 ± 0,2)

3. *Состав среды для определения содержания фолиевой кислоты:*

- глюкоза 40 г
- натрия цитрат[а)] 20 г
- раствор гидролизата казеина[б)] 120 мл
- раствор L-цистина, D,L-триптофана, L-аспарагина[н)] 100мл
- раствор аденина, гуанина,урацила и ксантина[о)] 10мл
- раствор тиамина, рибофлавина, никотиновой кислоты[п)] 10мл
- раствор кальция пантотената[р)] 8 мл
- раствор пиридоксина[с)] 24мл
- раствор ПАБК[т)] 10 мл
- раствор биотина[у)] 0,5 мл
- раствор солей Б[л)] 10 мл
- вода очищенная до 1000 мл

  pH (6,8 ± 0,2).

4. *Состав среды для определения содержания никотиновой кислоты (никотинамида):*

- глюкоза 40 г
- натрия ацетат 20 г
- раствор гидролизата казеина[б)] 100 мл
- раствор аденина, гуанина, урацила[е)] 10 мл
- раствор L-цистина и D, L-триптофана[г)] 100 мл
- раствор тиамина и кальция пантотената[ж)] 2 мл

- раствор рибофлавина [з)] 8 мл
- раствор пиридоксина и ПАБК [ф)] 2 мл
- раствор биотина [у)] 4 мл
- растворы солей А[к)] и солей Б[л)] по 10 мл
- вода очищенная до 1000 мл
  pH (6,8 ± 0,2)

5. *Приготовление питательных сред для определения содержания витаминов.* Глюкозу предварительно обрабатывают углем активированным осветляющим. Для этого к 200 мл 20 % раствора глюкозы добавляют 10 г угля, встряхивают в течение 40 мин и фильтруют через плотный бумажный фильтр. К раствору глюкозы добавляют остальные растворы, устанавливают pH 6,8 и доводят объем среды водой очищенной до 1000 мл. Среду нагревают на кипящей водяной бане 5 мин, охлаждают и фильтруют через бумажный фильтр. Готовую среду разливают по 70 мл в колбы вместимостью 100 мл, закрывают и хранят в морозильной камере при температуре минус 18 – 25 ^{0}C в течение 3 мес. Перед использованием среду размораживают при комнатной температуре.

Приготовление посевного материала

Для приготовления посевного материала используют один из нижеприведенных способов:

1) За 1 сут до испытания тест-микроорганизм пересевают на питательную среду соответствующего состава (п.3) и инкубируют при температуре (32,5 ± 2,5) ^{o}C в течение 16 – 24 ч. Клетки отделяют центрифугированием в асептических условиях, надосадочную жидкость сливают, а осадок суспендируют в 10 мл стерильного раствора натрия хлорида[х)]. Вносят 0,05 мл полученной суспензии в 10 мл стерильного изотонического раствора натрия хлорида. Мутность используемой суспензии должна быть (90 ± 1) % по шкале светопропускания фотометра-нефелометра при длине волны около 540 нм.

2) При определении D-биотина, кальция пантотената и никотиновой кислоты (или никотинамида) за 1сут до испытания небольшое количество исходной тест-культуры *L.plantarum* ВКМ В-758 (АТСС 8014) пересевают бактериологической петлей на агаризованную среду для лактобактерий (п.3.1). Инкубируют при температуре (32,5 ± 2,5) ^{0}C в течение 16–24 ч. После этого культуру смывают стерильным раствором натрия хлорида и доводят содержание микробных клеток до 10^9 КОЕ/мл по оптическому стандарту мутности. Затем переносят 0,2 мл взвеси в пробирку с 9,0 мл раствора натрия хлорида, перемешивают и используют в качестве посевного материала для внесения в основную питательную среду (пп. 4.1, 4.2 и 4.4).

Enteroccocus faecalis (faecium) ВКМ В-602 пересевают в жидкую питательную среду следующего состава:

- дрожжевой экстракт 2,0 г
- пептон 0,5 г
- глюкоза 0,5 г
- натрия ацетат 0,5 г
- твин-80 0,01г
- вода очищенная до 100 мл

  pH (6,8 ± 0,2).

Готовую среду разливают в пробирки по 10 мл и стерилизуют насыщенным паром под давлением в паровом стерилизаторе при температуре 120 – 121 ^{0}С в течение 10–15 мин.

Последующие этапы работы проводят по той же схеме, что и для *L.plantarum* ВКМ В-758 (АТСС 8014).

При испытании допускается использование коммерческих сухих стандартных питательных сред известных производителей.

В работе используют только химически чистую лабораторную посуду.

Примечания.

а) Приготовление 1 % раствора натрия цитрата. В мерной колбе вместимостью 1000 мл в воде очищенной растворяют 10 г натрия цитрата и доводят объем раствора водой до метки. Раствор годен к использованию в течение 7 сут в условиях хранения при температуре 2 – 8 ^{0}С.

б) Приготовление 10 % раствора кислотного гидролизата казеина (свободного от витаминов). При приготовлении среды для хранения культуры можно использовать коммерческий сухой солянокислый гидролизат казеина в соответствующем количестве или 10 % казеиновый кислотный гидролизат, для которого используют казеин размолотый.

В круглодонной колбе вместимостью 1000 мл смешивают 100 г казеина размолотого с 500 мл 20 % раствора хлористоводородной кислоты[ц)]. Смесь нагревают с обратным холодильником в течение 24 ч. Первые 5 – 8 ч растворения казеина нагревание проводят на кипящей водяной бане, затем на электроплитке с асбестовой сеткой. Из полученного гидролизата при пониженном давлении отгоняют хлористоводородную кислоту. К густому остатку прибавляют 300 мл воды очищенной, перемешивают и снова отгоняют до получения густого сиропа. Указанную операцию повторяют дважды. Далее растворяют оставшуюся массу в 100 мл воды, доводят pH раствора до 3,5 с помощью 30 % раствора натрия гидроксида и доводят объем раствора водой очищенной до 1000 мл. К готовому раствору прибавляют 20 г угля активированного, встряхивают в течение 1 ч,

фильтруют на воронке Бюхнера с отсасыванием. Обработку углем повторяют, получают бесцветный или светло-желтый раствор, который разливают во флаконы по 100 мл, и стерилизуют насыщенным паром под давлением в паровом стерилизаторе при температуре 120 – 121 ^{0}С в течение 15 мин. Хранят при температуре 2 – 8 ^{0}С.

в) Приготовление 1 % раствора натрия двууглекислого. Растворяют в 100 мл воды очищенной 1 г натрия двууглекислого и хранят при температуре 2 – 8 °С не более 1 нед.

г) Приготовление раствора L-цистина и D,L-триптофана.В мерной колбе вместимостью 500 мл в 20 мл 20 % раствора хлористоводородной кислоты[и)] растворяют 1 г L-цистина и 1 г D,L-триптофана (или 0,5 г L-триптофана), нагревают до 70 – 80 ^{0}С, периодически помешивая, до полного растворения аминокислот. После охлаждения объем доводят водой очищенной до метки и хранят при температуре 2 – 8 ^{0}С.

д) Приготовление раствора твина-80. Растворяют 2,5г твина-80 в 25 мл спирта. Хранят при температуре 2 – 8 ^{0}С.

е) Приготовление раствора аденина, гуанина и урацила. По 0,2 г аденина сульфата, гуанина и урацила растворяют в воде в мерной колбе вместимостью 100 мл с добавлением 10 мл 20 % раствора хлористоводородной кислоты[ц)] при длительном нагревании на кипящей водяной бане. После охлаждения доводят объем водой очищенной до метки и хранят при температуре 2 – 8 ^{0}С в течение 1 мес.

ж) Приготовление раствора кальция пантотената и тиамина. В мерной колбе вместимостью 100 мл растворяют 10 мг кальция пантотената и 5 мг тиамина хлорида в 25 мл 25 % спирта, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и хранят при температуре 2 – 8 ^{0}С в течение 2 нед.

з) Приготовление раствора рибофлавина. В мерной колбе вместимостью 200 мл растворяют 10 мг рибофлавина в небольшом количестве воды с добавлением 1 мл ледяной уксусной кислоты, доводят объем водой очищенной до метки. Хранят в емкости из темного стекла при температуре 2 – 8 ^{0}С в течение 2 нед.

и) Приготовление раствора *пара*-аминобензойной кислоты (ПАБК), никотиновой кислоты и пиридоксина. Раствор готовят в 25 % спирте из расчета, чтобы в 1 мл содержалось 10 мкг ПАБК, 40 мкг никотиновой кислоты и 20 мкг пиридоксина гидрохлорида. Раствор хранят при температуре 2 – 8 ^{0}С в течение 2 нед.

к) Приготовление раствора солей А. Растворяют 5 г калия фосфата однозамещенного и 5 г калия фосфата двузамещенного в 50 мл воды очищенной.

л) Приготовление раствора солей Б. Растворяют 1 г магния сульфата, 0,05 г натрия хлорида, 0,01 г железа сульфата и 0,05 г марганца сульфата в 50 мл воды очищенной.

Растворы солей А и Б хранят при температуре 2 – 8 ^{0}С.

м) Приготовление раствора рибофлавина, тиамина и D-биотина. В мерной колбе вместимостью 100 мл растворяют 20 мг рибофлавина, 10 мг тиамина хлорида и 4 мг D-биотина в 50 мл раствора 0,02 М уксусной кислоты, объем доводят водой очищенной до метки. Хранят в емкости из темного стекла при температуре 2 – 8 ^{0}С.

н) Приготовление раствора L-цистина, D,L-триптофана и L-аспарагина. По 1 г L-цистина, D,L-триптофана и L-аспарагина растворяют в 200 мл воде очищенной с добавлением 20 мл 20 % раствора хлористоводородной кислоты[ц)] в мерной колбе вместимостью 500 мл, нагревают до 70 – 80 °С, периодически помешивая, до полного растворения аминокислот. После охлаждения объем раствора доводят водой до метки и хранят при температуре 2 – 8 °С.

о) Приготовление раствора аденина, гуанина, урацила и ксантина. По 0,1 г аденина сульфата, гуанина хлорида, урацила и ксантина растворяют в воде очищенной в мерной колбе вместимостью 100 мл с добавлением 10 мл 20 % раствора хлористоводородной кислоты[ц)] при длительном нагревании на кипящей водяной бане. После охлаждения доводят объём водой очищенной до метки и хранят при температуре 2—8 ^{0} С.

п) Приготовление раствора тиамина, рибофлавина и никотиновой кислоты (никотинамида). По 10 мг тиамина хлорида, рибофлавина и 30 мг никотиновой кислоты растворяют приблизительно в 150 мл воды очищенной с добавлением 1 мл уксусной кислоты ледяной в мерной колбе вместимостью 250 мл, объём доводят водой очищенной до метки. Хранят в емкости из тёмного стекла при температуре 2–8 ^{0} С в течение 2 нед.

р) Приготовление раствора кальция пантотената. В мерной колбе вместимостью 100 мл растворяют 10 мг кальция пантотената в 25 мл воды очищенной, добавляют 25 мл спирта, доводят водой до метки. Хранят при температуре 2 – 8 ^{0}С в течение 1 мес.

с) Приготовление раствора пиридоксина. В мерной колбе вместимостью 100 мл растворяют 10 мг пиридоксина гидрохлорида в 25 мл воды очищенной, добавляют 25 мл этилового спирта, доводят водой до метки. Хранят при температуре 2 – 8 ^{0}С в течение 1 мес.

т) Приготовление раствора ПАБК. В мерной колбе вместимостью 100 мл растворяют 2мг ПАБК в 25 мл воды очищенной, добавляют 25 мл этилового спирта, доводят водой до метки и перемешивают. Хранят при температуре 2 – 8 ^{0}С в течение 1 мес.

у) Приготовление раствора D-биотина. В мерной колбе вместимостью 500 мл растворяют 1мг D-биотина при нагревании на кипящей водяной бане в 200 мл воды очищенной с добавлением 2 мл уксусной кислоты ледяной, доводят водой до метки. Хранят при температуре 2 – 8 °С.

ф) Приготовление раствора пиридоксина и ПАБК. По 10 мг пиридоксина и ПАБК растворяют в 25 мл воды очищенной в мерной колбе вместимостью 100 мл, прибавляют 25 мл этилового спирта, доводят объем раствора тем же растворителем до метки. Хранят при температуре 2 – 8 °С не более 1 мес.

х) Приготовление раствора натрия хлорида (0,9 %) изотонического. Растворяют 2,25 г натрия хлорида в 250 мл воды очищенной, разливают по 10–15 мл в пробирки, стерилизуют насыщенным паром под давлением в паровом стерилизаторе при температуре 120 – 121 ^{o}С в течение 15 мин.

ц) Приготовление 20 % раствора хлористоводородной кислоты. Разбавляют 425 мл хлористоводородной кислоты концентрированной (d = 1,19) водой очищенной до 1000 мл и перемешивают.

Определение активности ферментных лекарственных препаратов **ОФС.1.2.4.0013.15**

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на методы определения активности ферментов, которые основаны на определении скорости превращения субстратов для действия энзимов в соответствующие продукты ферментативной реакции, которые они катализируют.

Классификация ферментов

Фермент (*E*) – белок, обладающий каталитическими свойствами в реакции преобразования субстрата (*S*) в продукт (*P*).

Согласно международной номенклатуре (табл.), все ферменты подразделяются на 6 классов в зависимости от типа катализируемых ими реакций.

Таблица – Классификация ферментов

№ п/п	Название класса ферментов	Типы катализируемых реакций
1	Оксидоредуктазы	Окислительно-восстановительные
2	Трансферазы	Перенос атомных групп и молекулярных остатков
3	Гидролазы	Гидролиз
4	Лиазы	Негидролитическое расщепление C–C, C–O, C–N, C–S, P–O связей, а также отщепление различных групп с замыканием двойной связи
5	Изомеразы	Изомеризация
6	Лигазы	Соединение 2 молекул с использованием высокоэнергетических соединений

Особенности измерения активности ферментов, описываемые в фармакопейных статьях, определяется их принадлежностью к тому или иному классу.

Принцип, положенный в основу всех методов определения активности фермента (*E*), заключается в регистрации скорости убыли субстрата (*S*) (то есть вещества, на которое действует фермент) или скорости образования продукта реакции (*P*).

Простейшей схемой для описания кинетики ферментативных реакций является так называемая двухстадийная схема:

$$E + S \rightleftarrows ES \xrightarrow{k_{кат}} E + P, \qquad (1)$$

где: E – фермент;
S – субстрат;
P – продукты реакции;
$k_{кат}$ – каталитическая константа.

Начальная скорость (v_o) катализируемой ферментом реакции, при которой расходом субстрата можно пренебречь, описывается уравнением Михаэлиса–Ментен (2):

$$v_o = \frac{k_{кат} \cdot [E]_0 \cdot [S]_0}{K_м + [S]_0} = \frac{V_{макс} \cdot [S]_0}{K_м + [S]_0}, \qquad (2)$$

где: $V_{макс} = k_{кат} \times [E]_0$ – максимальная скорость реакции;
$[E]_0$ – начальная концентрация фермента;
$K_м$ – константа Михаэлиса.

Для аллостерических ферментов начальная скорость ферментативной реакции не подчиняется уравнению Михаэлиса–Ментен.

Для определения скорости ферментативной реакции через определенные промежутки времени отбирают пробы из реакционной смеси и

проводят количественное определение методами, основанными чаще всего на спектральных свойствах субстрата или продукта реакции.

Требования к условиям проведения ферментативной реакции

Ферментативная реакция должна проводиться в строго определенных условиях с учетом следующих факторов.

1. Начальная скорость реакции **(υ_o).** Скорость ферментативной реакции количественно можно измерить по убыли субстрата или по образованию продукта реакции.

Типичные кинетические кривые ферментативной реакции приведены на рис. 1. Для каждой ферментативной реакции могут быть подобраны условия, при которых начальный участок кривой линеен, т. е. зависимость концентрации образовавшегося продукта или израсходованного субстрата от времени наблюдения имеет прямо пропорциональный характер.

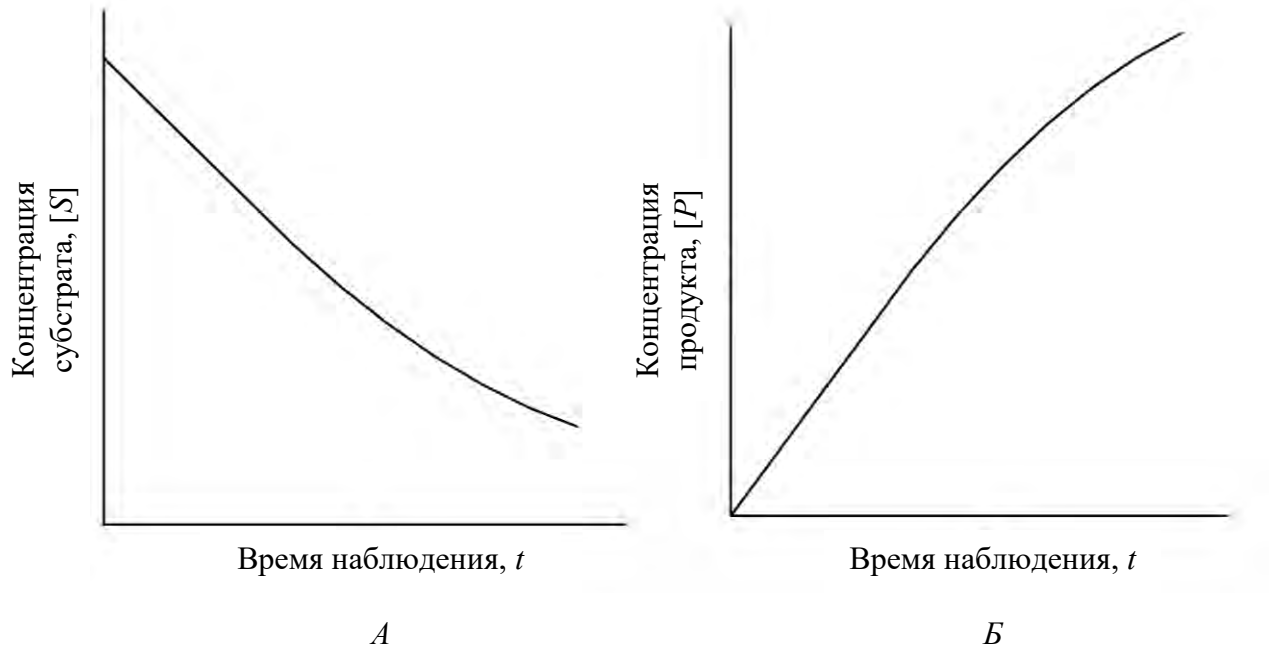


Рисунок 1 – Типичные кинетические кривые ферментативной реакции:
А – регистрация по скорости исчезновения субстрата реакции;
Б – регистрация по скорости образования продукта реакции

Начальная скорость реакции (υ_o) определяется как тангенс угла наклона линейного участка кривой.

Поскольку длительность прямолинейного участка кинетической кривой от опыта к опыту несколько изменяется, время инкубации (при использовании метода отбора проб) должно составлять не более 70 % и не менее 20% времени соответствующего прямолинейного участка.

2. Концентрация субстрата **($[S]_0$).** В большинстве случаев зависимость начальной скорости ферментативной реакции (υ_o) от начальной концентрации субстрата ($[S]_0$), согласно уравнению Михаэлиса–Ментен (2) описывается гиперболической функцией (рис. 2).

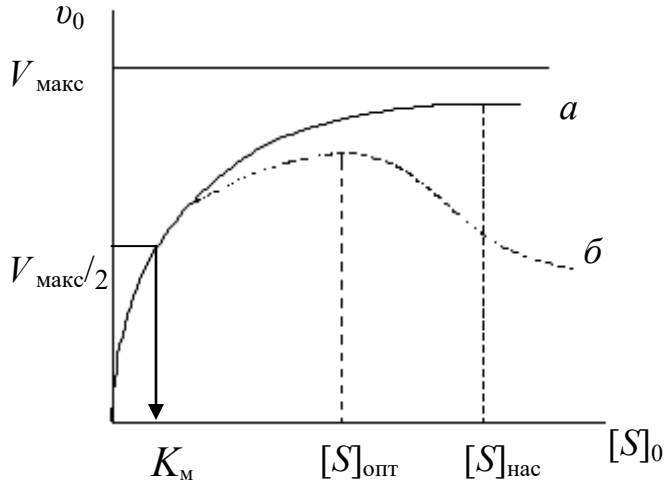


Рисунок 2 – Зависимость начальной скорости реакции υ_o от начальной концентрации субстрата $[S]_0$.

а – ферментативный процесс, подчиняющийся уравнению Михаэлиса-Ментен;
б – процесс, для которого характерно ингибирование фермента субстратом;
$[S]_0$ – начальная концентрация субстрата;
$[S]_{нас}$ – насыщающая концентрация субстрата;
$[S]_{опт}$ – оптимальная концентрация субстрата;
$V_{макс}$ – максимальная скорость реакции;

Начальная скорость реакции (υ_o) зависит от начальной концентрации субстрата ($[S]_0$) вплоть до его насыщающей концентрации. Под насыщающей концентрацией ($[S]_{нас}$) понимают такую концентрацию субстрата, при которой начальная скорость реакции практически перестает повышаться при дальнейшем увеличении концентрации субстрата, стремясь к своему предельному значению, называемому максимальной скоростью реакции $V_{макс}$

(рис. 2). Отрезок на оси абсцисс, соответствующий скорости, равной половине максимальной, будет представлять собой $K_м$. При проведении ферментативной реакции реакционная смесь должна содержать такое количество субстрата, которое обеспечит насыщение фермента в течение всего хода определения (количество субстрата, взятого для проведения ферментативной реакции, должно быть примерно на 30% выше насыщающей концентрации).

Если форма кривой зависимости начальной скорости реакции (υ_o) от начальной концентрации субстрата ($[S]_0$) отличается от гиперболической, определение параметров по уравнению Михаэлиса–Ментен невозможно. Такие отклонения наблюдаются в случае ингибирования или активации фермента субстратом, а также при работе с аллостерическими ферментами. В этом случае оптимальной является та концентрация субстрата, при которой начальная скорость реакции максимальна ($[S]_{опт}$)– точка перегиба на экспериментальной кривой зависимости начальной скорости реакции от начальной концентрации субстрата (рис. 2).

После выбора насыщающей концентрации субстрата необходимо проверить, сохраняется ли при ней линейная зависимость $[P]$ от t.

В качестве субстратов используются как природные вещества, такие как альбумин, казеин, крахмал, так и синтетические. Природные субстраты ферментов используют большей частью для подтверждения подлинности. Синтетические субстраты обеспечивают более высокую точность и лучшую воспроизводимость при количественном определении ферментативной активности.

3. Концентрация фермента **($[E]_0$).** В соответствии с уравнением Михаэлиса–Ментен начальная скорость ферментативной реакции (υ_o) в подавляющем большинстве случаев линейно зависит от концентрации фермента ($[E]_0$). Выбор оптимальной для каждого метода концентрации

фермента осуществляется экспериментально при помощи построения кривой зависимости начальной скорости реакции от концентрации фермента (рис. 3).

После выбора начальной концентрации фермента необходимо проверить, сохраняется ли при ней линейная зависимость [*P*] от *t* при выбранном значении насыщающей концентрации субстрата.

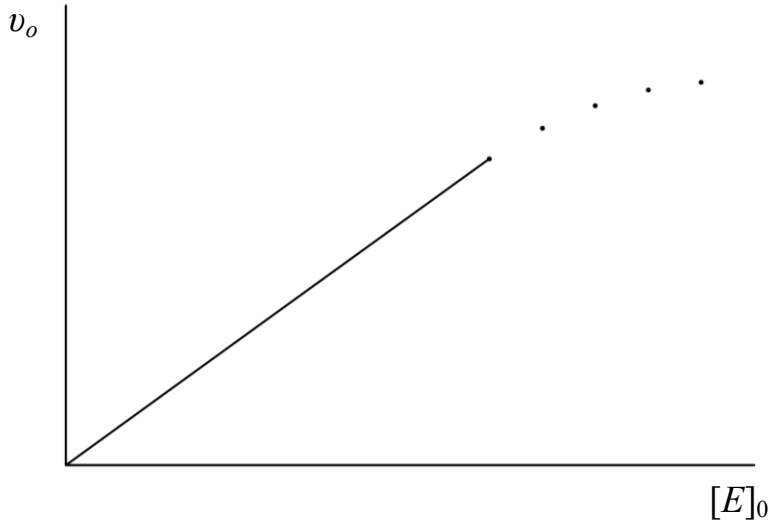


Рисунок 3 – Зависимость начальной скорости реакции v_0 от начальной концентрации фермента $[E]_0$

4. Температура. Особенностью ферментативных реакций является наличие колоколообразной зависимости скорости реакции от температуры в достаточно широком интервале температур, которая характеризуется «температурным оптимумом» реакции. Эта особенность объясняется наложением 2 эффектов: возрастанием скорости реакции при увеличении температуры и ускорением тепловой денатурации белковой молекулы, приводящей к инактивации фермента при достаточно высоких температурах. Обычно ферментативную реакцию рекомендуется проводить в термостате при температуре (37 ± 0,1) ºС, если нет иных указаний в фармакопейной статье. Предварительно каждый из реагентов нагревают до температуры 37 ºС.

5. Значение pH. Типичная кривая, описывающая для большинства ферментов pH-зависимость начальной скорости ферментативной реакции при

наличии 2 ионогенных групп в активном центре фермента, приведена на рис. 4.

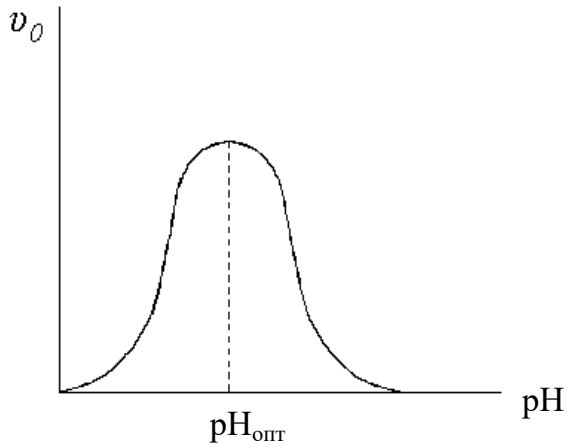


Рисунок 4 – Зависимость начальной скорости реакции v_0 от значения pH

Определение активности следует проводить при оптимальном значении pH, определенном при выбранных значениях концентрации фермента и насыщающей концентрации субстрата; использовании буферного раствора того состава, который не ингибирует фермент и температуре (37 ± 0,1) ºС, если нет других указаний в фармакопейной статье.

После выбора оптимального значения pH необходимо проверить, сохраняется ли при этом pH линейная зависимость [*P*] от *t* при выбранных значениях концентрации фермента и насыщающей концентрации субстрата.

6. Кофакторы. Существуют ферменты, для проявления каталитических свойств которых необходимо присутствие кофакторов – веществ, с помощью которых происходит активация ферментов. Кофакторами могут выступать один или несколько неорганических ионов, таких как Fe^{2+}, Mn^{2+}, Mg^{2+}, Zn^{2+} или комплексная органическая или металлорганическая молекула, называемая коферментом.

Для определения оптимальной концентрации кофактора следует построить кривую зависимости начальной скорости реакции от начальной концентрации кофактора, аналогичную зависимости начальной скорости

реакции от начальной концентрации субстрата, и по этой кривой выбрать насыщающую концентрацию кофактора.

После выбора насыщающей концентрации кофактора необходимо проверить, сохраняется ли при ней линейная зависимость [*P*] от *t*.

Конкретные параметры ферментативной реакции указываются в фармакопейных статьях.

Способы детекции

Для количественной регистрации скорости ферментативной реакции используют спектрофотометрические, флюресцентные, хеми- и биолюминесцентные методы детекции, основанные на спектральных свойствах субстрата или продукта реакции, а также детекцию с помощью микрокалориметрических датчиков и биодатчиков (биосенсоров) на основе хеми- и биолюминесценции; электрохимические методы, такие как потенциометрия, амперометрия и др. Для одних видов анализа детекция может проводиться непрерывно в ходе реакции, для других – после ее остановки.

Способ остановки ферментативной реакции должен быть указан в фармакопейной статье.

Единицы измерения ферментативной активности

Активность фермента измеряется количеством субстрата, преобразованного в продукт в единицу времени, и выражается в Международных единицах (МЕ) или единицах действия (ЕД).

МЕ – это такое количество фермента, которое при заданных условиях катализирует превращение одного микромоля субстрата за 1 мин (или одного микроэквивалента затронутых реакцией групп в тех случаях, когда атакуется более одной группы в каждой молекуле субстрата).

ЕД – это условная единица активности фермента, величина которой указывается в фармакопейной статье.

Нормируются:

- удельная активность препарата, которая выражается в единицах энзимной активности фермента (МЕ или ЕД) на 1 мг препарата или на 1 мг ферментного белка (в последнем случае удельная активность характеризует чистоту препарата). Определение содержания белка в препарате проводят одним из методов, приведенных в ОФС «Определение белка».
- доза**,** которая выражается в единицах ферментативной активности (МЕ или ЕД) на единицу лекарственной формы.

Перевод единиц активности ЕД в МЕ и обратно осуществляется опытным путем на основании статистически достаточного материала, обработанного в соответствии с ОФС «Статистическая обработка результатов определения специфической фармакологической активности лекарственных средств биологическими методами».

Определение активности ферментных препаратов в сравнении со стандартным образцом (СО)

С целью снижения погрешности методов определения ферментативной активности необходимо проводить определение ферментативной активности препарата в сравнении со стандартным образцом (СО) данного фермента.

Определение ферментативной активности испытуемого препарата и СО проводят в одинаковых условиях опыта.

Активность препарата (A) в соответствующих единицах (МЕ или ЕД) вычисляют по формуле:

$$A = \frac{A_0}{П_0} \bullet П \bullet K ,$$

где: A_0 – ферментативная активность СО в единицах (МЕ или ЕД) на 1мг белка или препарата;

$П_0$ – величина измеряемого параметра для СО;

$П$ – величина измеряемого параметра для испытуемого препарата;

K – коэффициент, выравнивающий концентрации растворов испытуемого препарата и СО.

Определение активности иммобилизованных ферментов

Иммобилизованными называются ферменты, молекулы которых физически или химически связаны с каким-либо носителем. В качестве носителей могут быть использованы природные и синтетические полимеры, органические низкомолекулярные носители, неорганические материалы. В зависимости от природы носителя иммобилизованные ферменты могут существовать в форме гелей, пленок, гранул, макропористых порошков и в других формах.

Активность иммобилизованных ферментов может нормироваться на массу носителя или его площадь.

Кинетические характеристики иммобилизованных ферментов, численно определяемые константой Михаэлиса $K_м$ и каталитической константой $k_{кат}$, могут существенно изменяться в зависимости от природы носителя и способа иммобилизации. Поэтому для корректного определения активности иммобилизованных ферментов необходим повторный подбор условий.

Биологические испытания гонадотропинов	**ОФС.1.2.4.0014.18** **Вводится впервые**

Настоящая общая фармакопейная статья определяет требования к биологическим методам испытания препаратов гонадотропных гормонов природного происхождения и рекомбинантные гонадотропины, а также на стандартные образцы.

ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Биологические испытания гонадотропинов основаны на их фармакологическом свойстве стимулировать развитие и функции половых органов. Методы количественного определения и подлинности препарата основаны на способности препаратов гонадотропинов увеличивать массу добавочных половых желез у неполовозрелых крыс-самцов и увеличивать массу матки у неполовозрелых крыс-самок.

Количественную оценку биологической активности проводят, сопоставляя действие гонадотропинов и их стандартных образцов (СО) на половые железы самцов и/или самок крыс. Метод применяют для аттестации стандартных образцов гонадотропинов, при отработке новых производственных технологий, при изучении стабильности, а также для оценки качества лекарственного средства (ЛС). Биологическую активность гонадотропинов определяют в субстанциях и лекарственных формах, приготовленных из этих субстанций.

ИСПЫТАНИЯ (ОБЩАЯ ЧАСТЬ)

Испытания проводят на неполовозрелых крысах обоего пола в возрасте 20–26 дней, массой тела 29,0–36,0 г, рандомизированных по массе на 7 групп, не менее 10 животных в каждой. Шесть групп − опытные, седьмая – контрольная.

При определении биологической активности гонадотропинов одновременно испытывают три дозы СО (малая, средняя и большая), соответствующего конкретному виду гонадотропина, и три дозы ЛС.

Рекомендуемое соотношение доз 1:2. Выбор доз зависит от чувствительности животных. Все рабочие растворы испытуемых ЛС и СО вводят крысам подкожно в холку.

Полученные результаты обрабатывают согласно требованиям ОФС «Статистическая обработка результатов определения специфической фармакологической активности лекарственных средств биологическими методами», подраздел 3.2: «Обработка результатов трёхдозовой рандомизированной постановки (на примере биологической активности гонадотропина хорионического)». Для расчётов используют электронные таблицы или специальные биометрические компьютерные программы, например, CombiStats, или аналогичное программное обеспечение.

Значение величины активности субстанций гонадотропинов должно быть не менее величины, приведённой в ОФС. Активность препаратов гонадотропинов должна составлять 80–125% от величины, указанной на этикетке.

В случае если полученные значения не удовлетворяют указанным требованиям, необходимо повторение испытания, при этом выполняют одно из двух следующих действий:

– корректировку величины указанной активности ЛС в соответствии с активностью, полученной в первом испытании;

или

– корректировку величин рабочих концентраций ЛС в соответствии с чувствительностью крыс, на которых проводится испытание.

По результатам повторных опытов принимают решение о качестве препарата.

Если в фармакопейных статьях на ЛС гонадотропинов даны иные указания, то следуют им.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ХОРИОНИЧЕСКОГО ГОНАДОТРОПИНА

Активность хорионического гонадотропина человека (чХГ), полученного из мочи беременных женщин, определяют по увеличению массы комплекса добавочных половых желёз у крыс-самцов (семенных пузырьков и предстательной железы) или по увеличению массы матки у крыс-самок, состоящей из тела и двух рогов.

Активность субстанции должна быть не менее 2500 МЕ/мг.

Определение биологической активности на крысах-самцах

Содержимое ампулы СО хорионического гонадотропина и ЛС чХГ разводят свежеприготовленным фосфатно-альбуминовым забуференным физиологическим раствором pH 7,2 (1) (Примечание 1), исходя из указанной активности (см. «Общую часть»), до концентрации гормона 100 МЕ/мл (основной раствор). В испытании могут быть использованы ориентировочные концентрации СО и ЛС: 1,5; 3,0 и 6,0 МЕ/мл и вводимые объёмы от 0,2 до 0,5 мл, если в фармакопейной статье не указано иное.

Свежеприготовленные растворы СО и ЛС чХГ вводят каждому животному в группе один раз в день в выбранном объёме в течение четырёх дней в одно и то же время. Животным контрольной группы вводят 0,9 % раствор натрия хлорида для инъекций в том же объёме. На пятый день проводят

эвтаназию животных и определяют массу тела. Вскрывают брюшную полость, выделяют комплекс половых желёз, освобождают от жировой ткани, слегка обсушивают фильтровальной бумагой и взвешивают с точностью до 0,001 г. Далее определяют относительную массу половых желёз путём деления их массы на массу тела животного.

Проводят статистическую обработку полученных результатов как указано в разделе «Общая часть».

Определение биологической активности хорионического гонадотропина на крысах-самках

Содержимое ампулы СО хорионического гонадотропина и ЛС чХГ разводят свежеприготовленным фосфатно-альбуминовым забуференным физиологическим раствором pH 7,2, исходя из указанной активности (см. «Общую часть»), до концентрации гормона 100 МЕ/мл (основной раствор). В испытании могут быть использованы ориентировочные концентрации СО и ЛС: 0,2, 0,4 и 0,8 МЕ/мл. В зависимости от чувствительности животных свежеприготовленные растворы СО и ЛС вводят от 0,2 мл до 0,5 мл на крысу в течение трёх дней приблизительно в одно и то же время суток, если в фармакопейной статье не указано иное. Животным интактной группы вводят натрия хлорида раствор 0,9 % для инъекций в том же объёме.

На пятый день проводят эвтаназию животных и определяют массу тела. Вскрывают брюшную полость, отделяют матку, освобождают от жировой и соединительной ткани и яичников. Легким нажатием выдавливают жидкость из матки, слегка обсушивают фильтровальной бумагой и взвешивают с точностью до 0,001г. Далее определяют относительную массу матки путём деления её массы на массу тела животного.

Проводят статистическую обработку полученных результатов как указано в разделе «Общая часть».

Испытание на отсутствие эстрогенов

Данный показатель включают в частные фармакопейные статьи для препаратов гонадотропина хорионического, получаемого из мочи беременных женщин.

Отбирают 5 мышей-самок массой тела от 19,0 до 21,0 г, у которых не менее чем за 2 недели до опыта удаляют яичники. Для удаления яичников в поясничной области вдоль позвоночника производят разрез кожи длиной от 1,0 до 1,5 см. Ориентиром нахождения яичников является жир (сальник), просвечивающий сквозь тонкий мышечный слой поясничной мускулатуры. Острыми концами глазного пинцета прокалывают мышечную ткань, захватывают сальник вместе с яичником и верхней частью рога матки и вытаскивают наружу. Рог матки вместе с жиром перевязывают лигатурой, отрезают яичник вместе с яйцеводом и верхней частью рога матки. Накладывают швы на мышечную ткань и кожу. Аналогичным образом удаляют яичник с другой стороны.

Не ранее чем через 14 дней ЛС растворяют в 0,9 % растворе натрия хлорида для инъекций до концентрации 100 МЕ/мл и вводят мышам с удалёнными яичниками подкожно в холку в объёме 0,25 мл на мышь два раза в день в течение 2 дней.

На четвертый и пятый день у животных опытной группы два раза в сутки берут стеклянной палочкой вагинальные мазки. Затем кончик палочки погружают в каплю воды на предметном стекле и осторожно размазывают. Полученный мазок рассматривают под микроскопом с увеличением 40х для распознавания клеточного состава мазка, который позволяет судить о различных стадиях полового цикла. При необходимости мазок можно окрасить метиленовым синим.

В мазках допускается наличие слизи, должны отсутствовать клетки эпителия (первая стадия полового цикла), а содержание лейкоцитов должно быть более 95 %, что свидетельствует об отсутствии эстрогенов в препарате.

Если наблюдается иная картина, то необходимо повторное испытание, по результатам которого принимают решение о качестве ЛС.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ФОЛЛИКУЛОСТИМУЛИРУЮЩЕГО ГОРМОНА

Определение биологической активности фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) в ЛС гонадотропина менопаузного и урофоллитропина, получаемых из мочи, проводят в сравнении с указанной активностью стандартного образца ФСГ + лютеинизирующего гормона (ЛГ), а для рекомбинантных ЛС – с СО рекомбинантного ФСГ (рФСГ).

Биологическую активность ФСГ или рФСГ оценивают по увеличению массы яичников у крыс-самок в возрасте 20–26 дней массой тела 29,0–36,0 г. Животных рандомизируют по массе на 7 групп не менее 10 животных в каждой. Шесть групп – опытные, седьмая – контрольная.

Содержимое ампулы СО гонадотропина менопаузного или СО рФСГ разводят свежеприготовленным фосфатно-альбуминовым забуференным физиологическим раствором pH 7,2 (1) с чХГ (Примечание 2), исходя из указанной активности ФСГ (см. «Общая часть»), до концентрации гормона 100 МЕ/мл (основной раствор). ЛС разводят таким же образом, исходя из предполагаемой величины активности ФСГ (см. «Общую часть»). Выбор доз зависит от чувствительности животных. Ориентировочные концентрации рабочих растворов СО и ЛС: 1,5; 3,0 и 6,0 МЕ/мл. Объем раствора, вводимый одному животному, варьирует от 0,2 до 0,4 мл, если в нормативной документации не указано иначе.

Свежеприготовленные растворы СО и ЛС вводят крысам в первый день дважды, в остальные − один раз, в одно и то же время суток в течение 4 дней. На пятые сутки проводят эвтаназию животных. У крыс определяют массу тела, вскрывают брюшную полость, отделяют яичники, освобождают от жировой и соединительной ткани, слегка обсушивают фильтровальной бумагой и

взвешивают с точностью до 0,001 г. Далее определяют относительную массу яичников путем деления их массы на массу тела животного.

Проводят статистическую обработку полученных результатов как указано в разделе «Общая часть».

Активность ФСГ субстанции гонадотропина менопаузного должна быть не менее 60 МЕ/мг.

Активность ФСГ урофоллитропина должна быть не менее 90 МЕ/мг.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЛЮТЕИНИЗИРУЮЩЕГО ГОРМОНА

Определение активности лютеинизирующего гормона (ЛГ) в гонадотропине менопаузном проводят путем сравнения с указанной активностью ЛГ стандартного образца ФСГ + ЛГ (мочевого), а для рекомбинантных ЛС − с активностью СО рекомбинантного ЛГ (рЛГ).

Действие гормона оценивают по увеличению массы матки у крыс-самок или по увеличению комплекса добавочных половых желёз у крыс-самцов в возрасте 20–26 дней массой тела 29,0–36,0 г. Животных рандомизируют по массе на 7 групп, не менее 10 крыс в каждой. Шесть групп − опытные, седьмая – контрольная.

Содержимое ампулы со стандартными образцами ФСГ+ЛГ и рЛГ разводят свежеприготовленным фосфатно-альбуминовым забуференным физиологическим раствором pH 7,2, исходя из указанной активности ЛГ (см. «Общая часть»), до концентрации гормона 100 МЕ/мл (основной раствор).

ЛС природных и рекомбинантных гонадотропинов разводят таким же образом, исходя из предполагаемой величины их активности (см. «Общая часть»).

Проводят статистическую обработку полученных результатов как указано в разделе «Общая часть».

Активность ЛГ в субстанции гонадотропина менопаузного должна быть не менее 60 МЕ/мг.

Определение биологической активности ЛГ на крысах-самках

В испытании могут быть использованы ориентировочные концентрации ЛС и СО: 0,2; 0,4 и 0,8 МЕ/мл; вводимые объёмы от 0,2 до 0,4 мл соответственно, если в частной статье не указано иное.

Свежеприготовленные растворы ЛС и СО вводят животным один раз в день в течение первых трёх дней приблизительно в одно и то же время. На пятый день проводят эвтаназию животных. У крыс определяют массу тела, вскрывают брюшную полость, отделяют матку, освобождают от жировой и соединительной ткани, яичников. Легким нажатием выдавливают из матки жидкость, слегка обсушивают фильтровальной бумагой и взвешивают с точностью до 0,001 г. Далее определяют относительную массу матки путём деления её массы на массу тела животного.

Проводят статистическую обработку полученных результатов как указано в разделе «Общая часть».

Определение биологической активности ЛГ на крысах-самцах

В испытании могут быть использованы ориентировочные концентрации СО и ЛС: 1,5; 3,0 и 6,0 МЕ/мл; вводимые объёмы от 0,2 до 0,5 мл, если в частной статье не указано иное.

Свежеприготовленные растворы СО и ЛС вводят крысам-самцам один раз в день в течение четырёх дней в одно и то же время. На пятый день проводят эвтаназию животных. У крыс определяют массу тела, вскрывают брюшную полость, вырезают комплекс добавочных половых желёз, освобождают от жировой и соединительной ткани, слегка обсушивают фильтровальной бумагой и взвешивают с точностью до 0,001 г.

Далее определяют относительную массу половых желёз путем деления их массы на массу тела животного.

Проводят статистическую обработку полученных результатов, как указано в разделе «Общая часть».

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОСТАТОЧНОЙ ЛЮТЕИНИЗИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ В УРОФОЛЛИТРОПИНЕ МОЧЕВОМ

Испытание проводят не менее чем на 40 неполовозрелых самках крыс в возрасте примерно 21 дня, различающихся по массе тела не более чем на 10 г.

Определение остаточной лютеинизирующей активности проводят на фоне действия СО сывороточного и хорионического гонадотропинов.

Для этого в первый день испытания всем крысам вводят 50 МЕ СО сывороточного гонадотропина в объеме 0,5 мл, а на четвёртый − 25 МЕ СО гонадотропина хорионического в том же объёме. В качестве растворителя используют свежеприготовленный фосфатно-альбуминовый забуференный физиологический раствор pH 7,2.

Через 6 дней после введения гонадотропина хорионического животных распределяют на 4 группы, не менее 10 особей в каждой, и внутривенно вводят испытуемый препарат и СО урофоллитропина или любой СО гонадотропина, содержащий ЛГ. Первая группа получает испытуемый препарат, а остальные − три рабочих разведения СО.

В качестве растворителя СО используют свежеприготовленный фосфатно-альбуминовый забуференный физиологический раствор pH 7,2. Дозы подбирают с учётом чувствительности животных. Готовят три рабочих разведения СО (примерные дозы 0,5; 1,0 и 2,0 МЕ/мл). При соотношении доз 1:2 малая доза СО должна вызывать снижение содержания аскорбиновой кислоты в яичниках у всех животных, в то время как большая доза не должна приводить к максимальному снижению содержания аскорбиновой кислоты у всех крыс, если не указано иное в нормативной документации.

Рабочее разведение испытуемого препарата готовят исходя из того, что соотношение количества МЕ ЛГ к МЕ ФСГ в урофоллитропине должно быть не более чем 1:60. Концентрация ФСГ в рабочем разведении испытуемого препарата должна быть равной 60Х, где Х – количество МЕ ЛГ в рабочем разведении СО средней концентрации.

Первой группе крыс вводят рабочее разведение испытуемого препарата в объёме 0,5 мл на животное, а второй, третьей и четвёртой группе − рабочие разведения СО в малой, средней и большой концентрации соответственно в том же объёме.

Точно через 4 ч после введения рабочих растворов испытуемого препарата и СО крыс подвергают эвтаназии. Вскрывают брюшную полость, извлекают яичники, освобождают от жировой и соединительной ткани и немедленно взвешивают.

Далее яичники от каждой крысы гомогенизируют отдельно в течение 2 мин в свежеприготовленном 2,5 % растворе метафосфорной кислоты (Примечание 3) при температуре 4° С и доводят объём до 7,0 мл. тем же раствором. Гомогенат отстаивают 30 минут при той же температуре, затем в течение 5 мин центрифугируют (2500 g; 4 °С). При необходимости надосадочную жидкость пропускают через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм.

Концентрацию аскорбиновой кислоты в пробах определяют спектрофотометрическим методом. Для этого непосредственно перед измерением оптической плотности для каждой пробы готовят раствор, смешивая 2 мл раствора натрия ацетата pH 7,0 (Примечание 4), 3 мл воды для инъекций и 2 мл раствора 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия (Примечание 5). Затем 2 мл полученного раствора добавляют к 2 мл надосадочной жидкости, перемешивают и через 30 мин измеряют оптическую плотность при длине волны 520 нм.

Для оценки полученных результатов строят стандартную кривую. В качестве стандарта используют раствор аскорбиновой кислоты. Для этого

определяют оптическую плотность серии разведений аскорбиновой кислоты в примерном диапазоне концентраций от 0,1 до 4,0 мг/мл. В качестве растворителя используют свежеприготовленный раствор метафосфорной кислоты с концентрацией 25 г/л.

Значения оптической плотности, полученные в результате измерения проб испытуемого препарата и СО, сравнивают со стандартной кривой аскорбиновой кислоты. Определяют её содержание в каждой пробе и выражают в миллиграммах на 0,1 г яичника. Вычисляют среднее значение и дисперсию.

Средняя концентрация аскорбиновой кислоты в яичниках крыс, получивших испытуемый препарат, должна быть не меньше, чем средняя концентрация аскорбиновой кислоты в яичниках животных, получивших среднюю дозу рабочего разведения СО (P = 0,95). Статистическую обработку проводят с помощью t-критерия Стьюдента для независимых выборок (ОФС «Статистическая обработка результатов определения специфической фармакологической активности лекарственных средств биологическими методами», подраздел 1: «Определение активности препарата биологическим методами»).

Примечания:

Приготовление фосфатно-альбуминового забуференного физиологического раствора, pH 7,2 (1). В мерный стакан вместимостью 500 мл помещают 5,4 г динатрия гидрофосфата и 3,8 г натрия хлорида, растворяют в 100 мл воды. В полученный раствор прибавляют 0,5 г бычьего сывороточного альбумина посредством нанесения последнего на поверхность раствора без перемешивания. После полного растворения альбумина раствор хорошо перемешивают, избегая вспенивания, и доводят объем раствора водой до метки 500,0 мл. Измеряют pH. При необходимости непосредственно перед использованием pH раствора доводят до 7,2 с помощью 10 % раствора фосфорной кислоты разведенной или 8,5 % раствора натрия гидроксида.

Приготовление фосфатно-альбуминового забуференного физиологического раствора, pH 7,2 (1), с гонадотропином хорионическим. В мерный стакан вместимостью 500 мл помещают 5,4 г динатрия гидрофосфата и 3,8 г натрия хлорида, растворяют в 100 мл воды. В полученный раствор прибавляют 0,5 г

бычьего сывороточного альбумина при нанесении его на поверхность раствора без перемешивания. После полного растворения альбумина раствор хорошо перемешивают, избегая вспенивания, прибавляют гонадотропин хорионический из расчета не менее 70 МЕ/мл, если в частной статье не указано иное, и доводят объем раствора водой до метки. Измеряют pH. При необходимости непосредственно перед использованием pH раствора доводят до 7,2 с помощью 10 % раствора фосфорной кислоты разведённой или 8,5 % раствора натрия гидроксида.

Приготовление 2,5% раствора метафосфорной кислоты. В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 25,0 г метафосфорной кислоты, добавляют 100 мл воды и перемешивают до растворения. Доводят объём раствора водой до метки.

Приготовление раствора натрия ацетата, pH 7,0. В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 45,3 г натрия ацетата, добавляют 100 мл воды и перемешивают до растворения. Доводят объём раствора водой до метки. Измеряют pH. При необходимости доводят pH раствора до 7,0 с помощью 30% уксусной кислоты.

Приготовление раствора 2,6-дихлорофенолиндофенолята натрия. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 50 мг 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия, добавляют 80 мл воды, перемешивают до растворения, доводят объем раствора водой до метки, перемешивают и фильтруют.

Вирусная безопасность ОФС.1.2.4.0015.18

Вводится впервые

Настоящая общая фармакопейная статья содержит требования к мерам по обеспечению вирусной безопасности лекарственных средств (ЛС), полученных с использованием материалов человеческого или животного происхождения.

При производстве лекарственные средства могут подвергаться вирусной контаминации. Риск вирусной контаминации возможен для всех лекарственных средств, при производстве которых используют сырье и материалы животного или человеческого происхождения.

Основными причинами ее возникновения являются использование инфицированных материалов (сырье, клеточные культуры) и случайное внесение вируса в ходе производственного процесса.

Риск вирусной контаминации возможен для ЛС, произведенных:

- из крови, мочи и других биологических жидкостей человека или животных;
- из органов и тканей человека или животных;
- с применением метода культивирования *in vivo*;
- при культивировании *in vitro* клеточных линий человеческого или животного происхождения.

Общая фармакопейная статья не распространяется на нетрадиционные трансмиссивные агенты, такие, как возбудители трансмиссивной губчатой энцефалопатии крупного рогатого скота и скрепи (почесухи) овец и коз.

Требования, предъявляемые к обеспечению вирусной безопасности для ЛС, полученных с использованием материалов человеческого или животного происхождения, устанавливаются уполномоченным органом в соответствии с требованиями действующих нормативно-правовых актов РФ.

РИСКИ ВИРУСНОЙ КОНТАМИНАЦИИ

Основными причинами контаминации вирусами лекарственных средств могут быть:

- использование исходного материала, полученного от инфицированного человека или животного;
- посторонние вирусы, привнесенные в процессе производства ЛС;
- использование контаминированных реактивов и продуктов животного происхождения в процессе производства ЛС;
- инфицированные донорские клетки и клеточные линии, контаминированные вирусами до их использования в качестве ГБК и РБК;
- контаминирующий вирус, привнесенный при создании производственной клеточной линии в ненадлежащих условиях.

Для обеспечения вирусной безопасности ЛС при производстве, должны проводиться следующие мероприятия:

1. отбор и испытание исходного сырья, и источника материалов на отсутствие вирусов, патогенных для человека;
2. оценка возможностей инактивации и/или элиминации вирусного агента в ходе производственного процесса;
3. проведение испытаний на отсутствие вирусной контаминации на критических стадиях производства.

При этом необходимо учитывать, что ни одно из перечисленных мероприятий не дает полной гарантии отсутствия вирусов, поэтому необходимо

использовать комплексный подход. Меры, принимаемые для управления риском вирусной контаминации ЛС, при производстве которых используется исходное сырье и материалы животного или человеческого происхождения, сводятся к минимизации риска, а не его исключению. Любой остаточный риск должен быть оценен в связи с возможной пользой от применения конкретного материала или сырья при производстве ЛС.

ТРЕБОВАНИЯ К ИСХОДНОМУ СЫРЬЮ

Для минимизации риска вирусной контаминации при отборе исходного сырья и материалов необходимо соблюдать следующие условия:

1. Сырье человеческого происхождения (кровь, моча, или другие биологические жидкости человека) заготавливают от здоровых доноров. Доноры крови и плазмы крови, мочи, или других биологических жидкостей должны проходить обследование в соответствии с нормативно-правовыми документами, действующими на территории РФ.
2. Сырье животного происхождения следует отбирать только от животных из хозяйств, благополучных по инфекционным заболеваниям. Сырье должно подлежать обязательной ветеринарно-санитарной экспертизе в соответствии с требованиями нормативно-правовых актов, действующих на территории РФ и сопровождаться соответствующими подтверждающими документами.
3. Следует определять род и источник происхождения животных, предназначенных для производства биотехнологических лекарственных препаратов, включая генотип и возраст. Животные должны быть взяты из хозяйств закрытого типа, благополучных по инфекционным заболеваниям. Статус хозяйства должен подтверждаться соответствующими документами.
4. Материалы и реагенты биологического происхождения (такие, как бараньи эритроциты, сыворотка эмбрионов телят, бычий сывороточный альбумин, человеческий трансферрин, инсулин, трипсин и др.),

питательные среды, используемые при производстве лекарственных средств, должны быть свободны от вирусной контаминации и иметь необходимое качество.

ВЫЯВЛЕНИЕ ВИРУСНОЙ КОНТАМИНАЦИИ

Испытание исходных материалов человеческого или животного происхождения является обязательным условием минимизации риска вирусной контаминации. Например, плазма крови человека подвергается обязательному тестированию на отсутствие поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg), антител к вирусу гепатита С, антиген р24 ВИЧ-1, антитела к ВИЧ-1, ВИЧ-2. При существовании высокой вероятности вирусной контаминации исходного сырья или клеточного субстрата может потребоваться применение специфичных тестов и/или подходов для выявления вирусов. Метод и объем тестирования на вирусную контаминацию и инактивацию вирусов на «критических» стадиях производства ЛС зависит от различных факторов, которые необходимо учитывать в индивидуальном порядке. Если используемые в производстве материалы (органы, ткани, биологические жидкости) или клеточная линия получены от человекообразных или нечеловекообразных обезьян, нужно дополнительно проверить их на наличие вирусов человека, прежде всего на вирусы, вызывающие иммунодефицит и гепатиты, если в нормативной документации не обоснован другой порядок действий. Для выявления вирусной контаминации также используют методы молекулярной генетики.

Особое внимание следует обращать на вирусы, которые часто контаминируют те виды животных, от которых получена линия клеток. Следует учитывать, что определенные линии клеток содержат эндогенные вирусы, например, ретровирусы, которые трудно или даже невозможно удалить. Более того, потенциальное вирусное загрязнение может привести к формированию как полных вирусных геномов, так и субгеномных вирусных фрагментов, приводящих к воспроизводству инфекционных вирусных частиц. Необходимо

учитывать возможность мутации эндогенных вирусов во время продолжительного культивирования. Присутствие нуклеотидных последовательностей вирусных геномов не исключает возможности использования клеток, в которых они обнаружены, но любая выявленная вирусная нуклеиновая кислота должна быть идентифицирована. При создании линии клеток, секретирующей моноклональные антитела, банк клеток следует контролировать на присутствие не только вирусов человека, но и вирусов мышей и других грызунов.

Линия клеток, которая продуцирует какие-либо вирусы, способные инфицировать клетки человека, может быть использована только при наличии исключительных обстоятельств. Все продукты, получаемые при использовании таких линий клеток, должны рассматриваться в каждом случае индивидуально. Если линия клеток секретирует инфекционные вирусы, следует предпринимать соответствующие меры предосторожности, чтобы защитить от заражения персонал, участвующий в производстве.

Особого внимания требует использование в производстве моноклональных антител линий клеток, трансформированных вирусом Эпштейна-Барр. В-лимфоциты человека, трансформированные этим вирусом, не секретируют вирусных частиц, но содержат комплекс копий вирусного генома и его нуклеотидные последовательности, которые могут быть определены с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) или путем совместного культивирования с соответствующей индикаторной линией клеток.

Следует выполнять соответствующие контрольные тесты по определению вирусов в используемых материалах и реактивах (например, трипсин, получаемый от свиней, тестируют на наличие парвовируса свиней). Необходим также контроль сыворотки крови крупного рогатого скота. Она не должна содержать потенциально опасные для человека вирусы − такие, как, вирус бычьей диареи, инфекционного бычьего ринотрахеита и парагриппа 3).

Необходимо учитывать, что все виды тестов имеют ограниченную чувствительность; например, возможность выявления в тесте низких концентраций вируса зависит от размера исследуемого образца. Поэтому ни одним из указанных подходов невозможно абсолютно точно установить вирусную безопасность препарата.

ПРОЦЕССЫ ВИРУСНОЙ ИНАКТИВАЦИИ ИЛИ ЭЛИМИНАЦИИ

При необходимости вирусной элиминации и/или инактивации вирусов в составе ЛС исходное сырье и материалы подвергаются обработке следующими методами:

- физическими стерилизация, обработка паром, сухой нагрев, радиация, фильтрация); (стерилизация насыщенным водяным паром под давлением, горячим воздухом, фильтрованием, ионизирующим излучением);
- химическими (разрушение суперкапсида оболочечных вирусов, содержащего липиды, с помощью детергентов);
- комбинированными (нейтрализация специфическими антителами, удаление вирусов хроматографическими методами, нагревание в форме суспензии с химическими агентами и другими).

Любой из используемых методов обработки должен быть валидирован и должен обеспечивать значительное снижение риска вирусной контаминации лекарственных средств при их производстве.

ВАЛИДАЦИЯ ПРОЦЕССОВ ВИРУСНОЙ ИНАКТИВАЦИИ ИЛИ ЭЛИМИНАЦИИ

Испытания могут выявить один или более видов вирусов, однако ни одно отдельное испытание не способно подтвердить присутствие всех известных вирусов. Более того, в целях получения положительного результата любые аналитические системы требуют некоторой минимальной вирусной контаминации. Испытания также ограничены статистическими погрешностями при отборе и исследовании проб. В связи с этим, подтверждение факта отсутствия в биологическом лекарственном препарате вирусов во многих

случаях происходит не только за счет прямого испытания на их наличие, но также путем подтверждения того, что процесс производства способен элиминировать или инактивировать их.

Валидация процессов элиминации вирусов является одним из важнейших факторов, обеспечивающих безопасность ЛС, при производстве которых используют потенциально инфицированный материал, например, плазму крови. В связи с тем, что известны случаи контаминации ЛС вирусными агентами, о которых не было известно на момент производства, особую значимость приобретает оценка эффективности процессов элиминации.

Если исходный материал или сырье недостаточно охарактеризованы, например, кровь, ткани и органы человека или животных, или если культивирование клеток осуществлялось в условиях *in vivo*, повышается вероятность вирусной контаминации. Поэтому процесс производства, как правило, должен включать один или несколько эффективных этапов инактивации и (или) элиминации вирусов. Отсутствие вирусов в конечном препарате во многих случаях подтверждается не только прямым их выявлением различными валидированными методиками, но и способностью применяемого режима очистки удалять и/или инактивировать вирусы. Тип и объем тестов на наличие/отсутствие вирусов и определение полноты элиминации вирусов, необходимые на разных этапах процесса производства ЛС, зависят от разных факторов и должны рассматриваться для каждого конкретного случая и последовательно. Следует принимать во внимание такие факторы как, природа выявляемых вирусов, свойства банка клеток и его характеристика, компоненты культуральной питательной среды, методы культивирования, планировка производственных помещений и спецификациия оборудования, результаты тестов на наличие/отсутствие вирусов после культивирования клеток, способность процесса элиминировать вирусы, тип продукта и предполагаемое его клиническое использование.

Методы очистки ЛС от вирусов и методы контроля степени его очистки в процессе производства, включая требования по контролируемым показателям, должны быть подробно описаны, обоснованы и валидированы. Следует убедиться в том, что процессы очистки не оказывают отрицательного влияния на свойства ЛС. При применении методов очистки, включающих аффинную хроматографию с использованием моноклональных антител, необходимо принять меры, гарантирующие, что эти и другие материалы, используемые в производстве, являющиеся потенциальными контаминантами, не ухудшат качество и безопасность конечного продукта.

Критерии для повторной переработки любого промежуточного или конечного полуфабриката продукта должны быть тщательно установлены, валидированы и обоснованы.

Для предотвращения попадания вирусов в готовые лекарственные формы предусматривается введение в технологию производства нескольких стадий вирусной инактивации и/или элиминации вирусов, для которых доказано снижение концентрации модельных вирусов. Включение процедур по инактивации/удалению потенциальных вирусных контаминантов не должно снижать биологическую активность ЛС.

ИСПЫТАНИЯ НА ОТСУТСТВИЕ КОНТАМИНАЦИИ ИНФЕКЦИОННЫМИ ВИРУСАМИ НА ЭТАПАХ ПРОИЗВОДСТВА

Испытания должны проводиться методами, охарактеризованными по специфичности и аналитической чувствительности.

В ЛС, полученных из крови, плазмы крови, мочи, органов и тканей человека, с помощью валидированных методов должно быть подтверждено отсутствие маркеров вирусов гепатита В и С, ВИЧ-1 и ВИЧ-2.

Тест активации моноцитов **ОФС.1.2.4.0016.18**

Вводится впервые

Настоящая статья описывает методы определения пирогенности лекарственных средств (ЛС), используемых для парентерального применения, с помощью теста активации моноцитов (МАТ).

Моноциты, активированные пирогенными веществами (ПВ) и бактериальными эндотоксинами (БЭ), экскретируют провоспалительные цитокины, концентрацию которых определяют с помощью спектрофотометрического, турбидиметрического, хромогенного или др. методов. Количество ПВ в ЛС определяют с помощью одного из трех методов, описанных в настоящей статье:

Метод А. Количественное испытание.

Метод В. Полуколичественное испытание.

Метод С. Сравнительное испытание с серией ЛС, утвержденной в качестве контрольной.

МАТ может являться альтернативой испытанию на пирогенность, проводимому на животных (кроликах), при условии выполнения валидированных процедур для испытуемого ЛС.

ВВЕДЕНИЕ

Качественное или количественное определение пирогенных веществ (ПВ), в том числе, бактериальных эндотоксинов (БЭ) и пирогенов небактериальной природы, активирующих моноциты человека или моноцитоподобные клетки, производится путем определения уровня

высвобождения эндогенных маркеров, таких, как провоспалительные цитокины (например, фактор некроза опухоли-α (TNF-α), интерлейкин-1β (IL1β) и интерлейкин-6 (IL-6)), которые участвуют в патогенезе лихорадки и вызывают пирогенную реакцию.

ЛС, содержащие ПВ небактериальной природы, дают более выраженную дозозависимую реакцию, чем реакция на БЭ. Поэтому испытание таких ЛС проводят без разведения препаратов и/или в минимальных разведениях.

Максимально допустимое разведение и предельная концентрация

Максимально допустимое разведение (МДР) испытуемого ЛС представляет собой наибольшее разведение, в котором возможно определение концентрации пирогенов, соответствующее значению предельного содержания ПВ, установленного для данного ЛС. Испытуемое ЛС может быть проверено в одном разведении или серии разведений при условии, что конечная степень разведения не превысит значения МДР.

Формулы для определения МДР и предельной концентрации пирогенных веществ

МДР вычисляют по формуле:

$$МДР = \frac{ПК_{ПВ} \cdot К_{ИР}}{ПО}$$, где:

$ПК_{ПВ}$ – предельная концентрация ПВ, которая является критерием качества для принятия положительного или отрицательного решения и выражается в эквиваленте единиц эндотоксина (ЭЕЭ) на миллиграмм или миллилитр, или в единицах биологической активности ЛС;

$К_{ИР}$ – концентрация испытуемого раствора, т.е. концентрация ЛС или действующего вещества, для которого указана $ПК_{ПВ}$;

ПО – предел обнаружения, концентрации ПВ, соответствующей минимальному пределу обнаружения. Концентрация ПВ, соответствующая минимальному пороговому значению, может быть определена по калибровочной кривой стандарта эндотоксина или серии ЛС, утвержденной в качестве контрольной, и выражается в ЭЕЭ/мл. Один ЭЕЭ стимулирует выделение такое же количество цитокинов, что и одна единица эндотоксина (ЕЭ).

Для вычисления предельной концентрации ПВ используют формулу, приведенную в ОФС «Бактериальные эндотоксины»:

$$ПК_{ПВ} = \frac{K}{M},$$

где:

K – пороговая пирогенная доза БЭ, вводимая в течение одного часа (ЕЭ/кг);

M – максимальная терапевтическая доза испытуемого ЛС, вводимая в течение одного часа (выражается в мг/кг, мл/кг или ЕД/кг массы тела человека).

Значения для К представлены в табл. 1 и соответствуют данным ОФС «Бактериальные эндотоксины»:

Таблица 1- Пути введения лекарственных средств

Путь введения	***К (ЕЭ/кг массы тела человека)***
Внутривенный	5,0
Внутривенный (для радиофармацевтических препаратов)	2,5
Интратекальный	0,2

Для ЛС с другими способами введения предельная концентрация БЭ обычно определяются в соответствии с ОФС «Бактериальные эндотоксины».

Пороговое значение эндотоксина (*X)* вычисляется по формуле:

$$\overline{x} + 3s$$

где:

$\overline{x}$ - среднее пороговое значение эндотоксина, полученное для 4-х повторов контрольной пробы или реакции холостого раствора *(blank solution);*

s - стандартное отклонение 4-х повторов контрольной пробы или реакции холостого раствора *(blank solution).*

ОПИСАНИЕ МЕТОДОВ

Тест активации моноцитов (МАТ) проводят в условиях, не оказывающих влияния на результаты теста и исключающих контаминацию пирогенными

веществами.

Испытуемый раствор инкубируют с моноцитами человека, например:

- с гепаринизированной периферической кровью человека, желательно, отобранной не более, чем за 4 ч до испытания;

- с моноцит-содержащей фракцией крови, например, содержащей мононуклеарные клетки периферической крови человека (МКПК), выделенные путем центрифугирования в градиенте плотности или иным способом;

- с линией моноцитоподобных клеток (моноцитов) человека.

Гепаринизированную периферическую кровь человека разводят культуральной средой (% (v/v)) или 0,9 % раствором натрия хлорида до концентраций от 2 до 50 %. В испытании используют МКПК или линии моноцитоподобных клеток в культуральной среде с добавлением плазмы донора или сыворотки крови группы IV (AB) с концентрацией клеток в суспензии 0,1-1,0 $\cdot 10^6$ клеток/мл. При использовании линий моноцитоподобных клеток сыворотку группы крови IV (AB) можно заменить на бычью эмбриональную сыворотку, инактивированную нагреванием. Культуру клеток готовят при температуре 37 ± 1°C в увлажненной атмосфере с 5% $C0_2$.

Культура клеток, используемая для выделения маркеров ПВ, должна быть функционально стабильной. Реакцию выделенного маркера сравнивают с реакциями на стандартный эндотоксин или на серию ЛС, утвержденную в качестве контрольной. Реакцию выбранного маркера калибруют с использованием соответствующего стандарта.

ПОДГОТОВКА К ИСПЫТАНИЯМ

Стеклянная и пластиковая посуда, используемая в испытании не должна содержать пирогенных веществ, в количествах, определяемых в тесте, и не оказывать влияние на ход реакции. Всю стеклянную посуду и другую аппаратуру, устойчивую к нагреванию, депирогенизируют в сухожаровом шкафу при температуре 250°C не менее 30 мин в соответствии с валидированной процедурой.

ИСТОЧНИКИ КЛЕТОК И ИХ КВАЛИФИКАЦИЯ

Источниками клеток для МАТ являются цельная кровь или мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК).

Используют цельную кровь, полученную от индивидуальных доноров, или пулы цельной крови, а МКПК выделяют, как из крови, полученной от индивидуальных доноров, так из пулов цельной крови.

Доноры крови должны проходить обследование в соответствии с действующими нормативными правовыми документами.

Пулы цельной крови или компонентов крови (например, МКПК) должны:

- состоять из порций крови как минимум от 4-х индивидуальных доноров, желательно от восьми или более доноров;

- формироваться путем отбора из каждой донации примерно равных объемов крови или равного количества клеток в приблизительно одинаковом объеме крови.

Для квалификации объединенных пулов клеток в течение 4 ч с момента сбора крови строят кривые дозозависимости пула с использованием стандартных растворов (СО) стандарта эндотоксина не менее, чем в 4-х разведениях, выполненных в соответствии с принципом геометрической прогрессии, например, в диапазоне от 0,01 ЕЭ/мл до 4 ЕЭ/мл. Полученные кривые должны отвечать критериям приемлемости калибровочной кривой. Источники клеток, предназначенные для использования в МАТ, например, цельная кровь человека или компоненты крови, такие, как МКПК или линии моноцитоподобных клеток, могут быть криоконсервированными. Пулы криоконсервированных клеток получают объединением перед замораживанием, или объединением единичных криоконсервированных донорских порций сразу же после оттаивания.

Пулы криоконсервированных клеток должны:

- состоять из порций крови минимум от 4-х индивидуальных доноров, предпочтительно от восьми или более доноров;

- формироваться путем отбора из каждой донации примерно равных

объемов крови или равного количества клеток в приблизительно одинаковом объеме крови.

Квалификацию криоконсервированной цельной крови или клеток проводят сразу же после оттаивания (или объединения, в случае необходимости), а полученные дозозависимые кривые для криоконсервированной крови или клеток должны соответствовать критериям приемлемости теста. Для успешного выполнения МАТ используют непрерывно культивируемую клеточную линию моноцитов человека. Для оптимизации метода могут использоваться клоны клеточной линии. Клетки хранят в асептических условиях и регулярно контролируют на заражение микоплазмами. Дополнительно постоянно проверяют подлинность клеток (например, время удвоения, морфологию и функцию) и стабильность клеточной линии.

Функциональную стабильность клеточной линии оценивают при наблюдении за её состоянием в процессе повседневных испытаний с учетом количества пассажей. Критериями функциональной стабильности являются рост, максимальная реакция в испытании, «фоновый шум» и экспрессия рецептора. Экспрессию рецептора проверяют с помощью специфических лигандов, например, липополисахарида (ЛПС) для Toll-подобного рецептора 4 (TLR4), липотейхоевой кислоты (LTA) для Toll-подобного рецептора 2 (TLR2), синтетического бактериального липопротеина для TLR2-TLR1 или синтетического бактериального липопротеина для TLR2-TLR6.

ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ ИСПЫТАНИЯ

Для обеспечения прецизионности и достоверности эксперимента проводят предварительные испытания, в которых проверяют соблюдение критериев для калибровочной кривой, отсутствие взаимодействия растворов в ходе испытания, способность методики обнаруживать БЭ и ПВ, отличные от БЭ, отсутствие влияния испытуемых растворов на систему обнаружения (реактивы, оборудование, посуду и расходные материалы).

КРИТЕРИИ ПРИЕМЛЕМОСТИ КАЛИБРОВОЧНОЙ КРИВОЙ

Для построения калибровочной кривой готовят не менее 4-х концентраций растворов стандарта эндотоксина. Проводят испытание, используя не менее 4-х повторов каждой концентрации раствора.

Контрольный уровень высвобожденного маркёра без добавления раствора стандарта эндотоксина должен быть доведен до минимально возможного.

Для калибровочной кривой должны выполняться два критерия приемлемости:

- регрессионная зависимость ответов (соответственно преобразованных при необходимости) от логарифма концентрации БЭ должна быть статистически значима (P=99%);

- регрессионная зависимость ответов от логарифма концентрации БЭ должна быть линейна (P=95%). При анализе S-образной кривой с помощью четырёхпараметрического метода, она не должна значимо отличаться от теоретической (ОФС «Статистическая обработка результатов определения специфической фармакологической активности лекарственных средств биологическими методами», подраздел 3.9).

ИСПЫТАНИЕ НА МЕШАЮЩИЕ ФАКТОРЫ

Для подтверждения отсутствия влияния испытуемого раствора на результаты определения ПВ проводят предварительную валидацию методики. Валидацию необходимо проводить при любых изменениях, влияющих на результаты испытания. Используя соответствующий растворитель, делают ряд разведений ЛС в геометрической прогрессии таким образом, чтобы они не превышали МДР испытуемого ЛС.

Для **Метода А** (количественный метод) готовят такие же разведения испытуемого ЛС, к которым прибавляют БЭ в концентрации, равной или близкой к середине калибровочной кривой.

Для **Метода В** (полуколичественный метод) готовят разведения, равные

удвоенному значению предела обнаружения (ПО).

Испытания полученных серий разведений проводят одновременно в одном эксперименте. Для вычисления концентрации эндотоксина, выраженной в ЭЕЭ, используют калибровочную кривую для каждого раствора. Вычисляют среднее значение полученной концентрации БЭ в растворе, содержащем добавленный стандарт эндотоксина. Для этого из установленной средней концентрации эндотоксина, содержащего добавленный стандарт эндотоксина, вычитают среднюю концентрацию эндотоксина в растворе ЛС (при его наличии).

Результаты считают удовлетворительными, если при испытании измеренная концентрация БЭ после добавления стандарта эндотоксина в испытуемый раствор, составляет 50-200 % от известной концентрации БЭ.

Если испытание не отвечает данному критерию, переходят к **Методу С**.

При использовании **Метода С** раствор ЛС испытывают в трех концентрациях:

– наибольшая концентрация ЛС (без разведения или наименьшее разведение), при которой наблюдается максимальное высвобождение выбранного маркера;

– двукратное разведение концентрации ЛС;

– концентрации ЛС в разведении ниже двукратного, например, 4-х кратное.

Концентрация испытуемого ЛС, при которой наблюдается наибольшее высвобождение маркера, может зависеть от особенностей донора клеток/крови, а также серии клеток. Поэтому нНеобходимо проводить валидацию методики в отношении используемых клеток в трех независимых испытаниях с использованием в каждом из них клеток от различных доноров.

Дальнейшие испытания могут быть продолжены в случае, если при минимальном разведении раствора А регистрируется максимальное высвобождение количества соответствующего маркера из клеток большинства доноров, а также при тестировании с этими клетками растворов В и С,

полученными при 2-кратном и 4-кратном разведении раствора А (Таб.2).

Три разведения, используемые в исследовании, не должны превышать МДР; кратность разведения для этих трех растворов обозначаются как f_1, f_2 и f_3. После валидации методики выполняются стандартные испытания с объединенными клетками от индивидуальных доноров, или с единичным пулом, или с клетками от 1 пассажа линии моноцитоподобных клеток человека.

ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ В ОТНОШЕНИИ ВЕЩЕСТВ-АКТИВАТОРОВ МОНОЦИТОВ, ОТЛИЧНЫХ ОТ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЭНДОТОКСИНОВ

В предварительных испытаниях также подтверждают способность выбранной методики обнаруживать провоспалительные или пирогенные вещества, отличные от БЭ. Для этого можно использовать архивные образцы, в которых наличие ПВ, отличных от БЭ, было определено в ранее проведенных исследованиях на основании положительных реакций в испытании «Пирогенность» на кроликах или по развитию побочных эффектов у человека. При отсутствии таких серий ЛС в предварительные испытания должна быть включена валидация используемой методики с применением специфических лигандов для Toll-подобных рецепторов, например, пептидогликанов, липотейхоевых кислот или синтетических бактериальных липопротеинов.

После подбора оптимального разведения раствора испытуемого ЛС для дальнейшего исследования проводят проверку его влияния на результаты методики измерения маркера (например, методом иммуноферментного анализа.) Различия в определяемых концентрациях различных серий разведений стандарта выбранного маркера в присутствии и отсутствии испытуемого ЛС должно находиться в диапазоне ± 20 %.

МЕТОД А: КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ИСПЫТАНИЕ

В методе А концентрацию ПВ вычисляют с помощью калибровочной кривой стандарта эндотоксина.

Метод А включает сравнение исследуемого препарата со стандартной кривой «доза − реакция эндотоксина». Концентрация ПВ в испытуемом ЛС не

должна превышать величину $ПК_{ПВ}$.

После валидации методики готовят растворы, приведенные в табл. 2. Клетки от каждого из 4-х доноров, единичного пула или от первого пассажа линии моноцитоподобных клеток человека инкубируют в 4-х повторностях с каждым из растворов.

Таблица 2 - Схема проведения эксперимента методом А: «Количественное испытание»

Раствор	**Раствор/фактор разведения**	**Добавленный стандарт эндотоксина (ЕЭ/мл)**	**Число повторностей**
A	Испытуемый раствор/ f	Нет	4
B	Испытуемый раствор/2 × f	Нет	4
C	Испытуемый раствор/4 × f	Нет	4
D	Испытуемый раствор/f	Середина калибровочной кривой эндотоксина (R_3)	4
R_0	Апирогенный физиологический раствор или испытуемый растворитель	Нет (отрицательный контроль)	4
R_1-R_4	Апирогенный физиологический раствор или испытуемый растворитель	4 концентрации стандартного раствора эндотоксина	4 (для каждой концентрации)

Раствор А − раствор испытуемого ЛС в наименьшем разведении, для которого концентрация эндотоксина находится в пределах от 50 до 200 %.

Раствор В − раствор испытуемого ЛС в 2-кратном разведении, не превышающем значение МДР.

Раствор С − раствор 2-кратного разведения раствора В, не превышающее значение МДР.

Раствор D − раствор А в выбранном разведении, к которому добавлен стандарт эндотоксина. Конечная концентрация БЭ в анализируемом растворе должна быть близкой среднему значению калибровочной кривой концентраций

стандарта эндотоксина (положительный
контроль испытуемого ЛС − R_3).

Раствор R_0 − отрицательный контроль; стандарт эндотоксина не добавляется.

Растворы R_1-R_4 − растворы стандарта эндотоксина, используемые для построения калибровочной кривой, в тех же концентрациях, которые использовались при проведении анализа «Проверка достоверности критериев калибровочной кривой» (положительный контроль).

Учет результатов. Результаты, полученные после проведения метода А, должны соответствовать двум критериям калибровочной кривой (раздел «Критерии приемлемости калибровочной кривой»).

Определяемая концентрация эндотоксина, полученная путем вычитания из величины концентрации эндотоксина раствора D величины концентрации эндотоксина в растворе А, должна находиться в диапазоне 50-200 %. Независимо от способа получения моноцитов (индивидуальный донор, пул доноров, клеточная линия) для вычисления концентрации эндотоксина в растворах А, В и С каждой из четырех повторностей используется калибровочная кривая стандарта эндотоксина R1-R4.

Испытуемое ЛС отвечает требованиям нормативной документации по результатам проводимых испытаний с помощью МАТ, если средняя концентрация ЕЭЕ, измеренная во всех четырех повторностях испытания растворов А, В и С с учетом разведений и концентраций, меньше $ПК_{ПВ}$, установленного для ЛС.

МЕТОД В: ПОЛУКОЛИЧЕСТВЕННОЕ ИСПЫТАНИЕ

В методе В концентрацию ПВ определяют при сравнении испытуемого ЛС с растворами стандарта эндотоксина. Исходный раствор стандарта эндотоксина готовят из вторичного стандарта, аттестованного относительно международного стандартного образца.

Для получения положительного результата при выполнении испытания

концентрация ПВ в испытуемом ЛС должна быть меньше, чем $ПК_{ПВ}$. Для принятия решения о положительном или отрицательном результате испытания используют ответ, полученный для раствора А, если не предусмотрено иное.

Используя валидированную методику испытания, проводят ее в 4-х повторностях, для чего готовят растворы, указанные в табл.3, которые добавляют в 4-х повторностях к клеткам от каждого из 4-х доноров или с единичным пулом или от первого пассажа линии моноцитоподобных клеток человека, а затем инкубируют их в оптимальных условиях.

Таблица 3 - Схема проведения эксперимента методом В

Раствор	**Раствор/фактор разведения**	**Добавленный стандарт эндотоксина (ЕЭ/мл)**	**Количество повторностей**
A	Испытуемый раствор/*f*	Нет	4
B	Испытуемый раствор/f_1	Нет	4
C	Испытуемый раствор/f_2	Нет	4
D	Испытуемый раствор/*f*	Стандарт эндотоксина 2×ПО используемой системы	4
E	Испытуемый раствор/f_1	Стандарт эндотоксина 2×ПО используемой системы	4
F	Испытуемый раствор/f_2	Стандарт эндотоксина 2×ПО используемой системы	4
R_0	Апирогенный физиологический раствор или испытуемый растворитель	Нет (отрицательный контроль)	4
R_1	Апирогенный физиологический раствор или испытуемый растворитель	Стандарт эндотоксина 0,5×ПО используемой системы	4
R_2	Апирогенный физиологический раствор или испытуемый растворитель	Стандарт эндотоксина 1×ПО используемой системы	4
R_3	Апирогенный физиологический раствор или испытуемый растворитель	Стандарт эндотоксина 2×ПО используемой системы	4
R_4	Апирогенный физиологический раствор или испытуемый растворитель	Стандарт эндотоксина 4×ПО используемой системы	4

Раствор A − раствор ЛС в разведении, обозначенном в таблице как *f*, при котором было проведено испытание на мешающие факторы.

Раствор B − раствор ЛС в разведении, обозначенном в таблице как f_1, не превышающем МДР. Кратность раствора конкретного ЛС выбирается в результате анализа данных валидации, например, МДР/2.

Раствор C − раствор ЛС в разведении, обозначенном как f_2, не превышающем МДР. Кратность раствора конкретного ЛС выбирается в результате анализа данных валидации, например, МДР.

Раствор D − положительный контроль ЛС. Раствор A с добавлением стандарта эндотоксина 2×ПО используемой системы (как определено в предварительном испытании).

Раствор E − положительный контроль ЛС. Раствор B с добавлением стандарта эндотоксина 2×ПО используемой системы.

Раствор F − положительный контроль ЛС. Раствор C с добавлением стандарта эндотоксина 2×ПО используемой системы.

Раствор R_0 − отрицательный контроль.

Раствор R_1 − стандарт эндотоксина 0,5×ПО используемой системы.

Раствор R_2 − стандарт эндотоксина 1×ПО используемой системы.

Раствор R_3 − стандарт эндотоксина 2×ПО используемой системы.

Раствор R_4 − стандарт эндотоксина 4×ПО используемой системы.

Учет результатов. Результаты, полученные после проведения испытания методом B, учитываются в том случае, если полученное среднее значение моноцитов на добавление растворов от R_0 до R_4 постепенно увеличивается. Среднее значение реакции на R_0 может быть равно среднему значению реакции на R_1. Независимо от способа получения моноцитов (индивидуальный донор, пул доноров, клеточная линия), средний ответ на раствор R_2 должен быть больше положительного порогового значения. Результаты ниже этого положительного порогового значения рассматриваются как отрицательная реакция. Если среднее значение ответа на R_1 или R_2 превышает пороговое

значение, то значения реакции испытуемого раствора должны быть отрицательными и таким образом, выдерживать испытание.

Средние значения отрицательных результатов для растворов испытуемого ЛС (A, B и C) и растворов с добавленным стандартом эндотоксина (D, E или F соответственно) сравниваются с данными реакции R_3 для определения концентраций ПВ, выраженных в процентах от ожидаемых значений и концентрация ПВ в испытуемом ЛС меньше предельного содержания пирогенов для данного источника клеток в том случае, если раствор испытуемого ЛС, выбранный для оценки соответствия/несоответствия при минимальном его разведении даёт отрицательные результаты и определяемая концентрация добавленного в растворы стандарта эндотоксина находится в диапазоне от 50 до 200 %.

МЕТОД С: СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИСПЫТАНИЕ С СЕРИЕЙ ЛС, УТВЕРЖДЕННОЙ В КАЧЕСТВЕ КОНТРОЛЬНОЙ

При использовании метода С проводится сравнение испытуемого ЛС с серией ЛС, утвержденной в качестве контрольной. Контрольная серия выбирается в соответствии с обоснованными и утвержденными критериями. Данное испытание проводят в том случае, когда испытуемое ЛС оказывает выраженное мешающее действие, но не может быть разведено в диапазоне МДР для устранения этого действия, так как данное ЛС содержит (или предполагается, что содержит) пирогенные примеси, отличные от БЭ. Реакции на такие ПВ протекают быстрее и могут быть более выраженными, чем ответы на БЭ. В связи с этим такие испытания необходимо проводить в диапазоне разведений, которые включают и минимальное разведение. Процедура теста описана ниже и включает пример сравнения испытуемой серии с контрольной.

Используя валидированную методику испытания, готовят растворы, указанные в табл. 4, добавляют их в 4-х повторностях к клеткам от каждого из доноров или, пулом или от первого пассажа линии моноцитоподобных клеток человека, затем инкубируют.

Таблица 4 - Схема эксперимента методом С

Раствор	Раствор/фактор разведения	Число повторностей
A	Раствор контрольной серии ЛС/f_1	4
B	Раствор контрольной серии ЛС /f_2	4
C	Раствор контрольной серии ЛС /f_3	4
D	Раствор испытуемого ЛС/f_1	4
E	Раствор испытуемого ЛС/f_2	4
F	Раствор испытуемого ЛС/f_3	4
G	Положительный контроль (стандарт эндотоксина)	4
R_0	Растворитель (отрицательный контроль)	4

Растворы A, B и C – разведения контрольной серии ЛС с кратностью разведения f_1, f_2, f_3, определенные в испытании на мешающие факторы.

Растворы D, E и F – разведения испытуемого ЛС с кратностью разведений f_1, f_2, f_3, определенные для контрольной серии в испытании на мешающие факторы.

Раствор G – раствор стандарта эндотоксина, при котором наблюдается четкий положительный ответ (положительный контроль жизнеспособности клеток).

Раствор R_0 – растворитель, используемый для разведения испытуемого ЛС (отрицательный контроль).

Учет результатов. Все результаты должны быть получены на клетках, у которых раствор G и хотя бы один из растворов A, B или C, вызывают ответ, превышающий минимальный уровень высвобождения маркёра (раствор R_0). Для каждого источника клеток (индивидуального донора, пула доноров, клеточной линии) используют дозозависимую кривую и вычисляют средние ответы растворов A-F.

С этой целью готовят в двух повторностях четыре концентрации

стандарта маркера, разведенного в геометрической прогрессии, и отрицательного контроля. Затем вычисляют среднюю величину реакции моноцитов на растворы A-F. Суммируют среднюю величину реакции моноцитов на растворы A, B и C и средние ответы на растворы D, E и F. Делят сумму средних ответов на растворы D, E и F на сумму средних ответов на растворы A, B и C. Испытуемое ЛС отвечает требованиям испытания для данного источника клеток, если полученное значение соответствует определенному критерию приемлемости, не превышающему 2,5.

КРИТЕРИИ СООТВЕТСТВИЯ/НЕСООТВЕТСТВИЯ

При использовании клеток от индивидуальных доноров ЛС должно соответствовать требованиям МАТ настоящей статьи для клеток от каждого из 4-х различных доноров.

В случае, если ЛС выдерживает испытание с клетками 3-х доноров, а клетки 4-го донора исключены, поскольку не отвечают критериям проведения испытания или имеют положительную реакцию, то испытание продолжают с клетками от других 4-х доноров, которые не использовались в первом испытании.

Испытуемое ЛС выдерживает испытание с клетками 7 из 8 различных доноров, так как в этом случае допускается только 1 положительная реакция при использовании клеток от 8 доноров.

Если источник моноцитов представляет клетки, объединенные от ряда индивидуальных доноров, испытуемое ЛС должно соответствовать требованиям МАТ с испытанием первого пула клеток. При использовании линии моноцитоподобных клеток человека ЛС должно выдерживать испытание с первым пассажем линии клеток.

Для более точного количественного определения уровня содержания ПВ Методы A, B и C могут выполняться с использованием других разведений испытуемого ЛС, не превышающих МДР.

Определение специфической активности препаратов эритропоэтина	**ОФС.1.2.4.0017.18** **Вводится впервые**

Настоящая общая фармакопейная статья определяет основные требования к методике определения специфической активности препаратов рекомбинантного эритропоэтина с использованием нормоцитемических мышей и распространяется на субстанции и лекарственные формы эритропоэтина.

ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Биологический метод определения специфической активности в условиях *in vivo* основан на способности эритропоэтина стимулировать эритропоэз у нормоцитемических мышей. Активность препарата сравнивают с активностью стандартного образца (СО) эритропоэтина и выражают в международных единицах (МЕ). Рассчитанная специфическая активность должна быть от 80 до 125 % от заявленной активности, доверительный интервал (*P=0,95*) в диапазоне от 64 до 156 %. Специфическую активность и доверительный интервал рассчитывают методом параллельных линий с помощью программного обеспечения.

В качестве СО эритропоэтина может быть использован международный стандартный образец для количественного определения специфической активности, стандартный образец Европейской Фармакопеи, а также СО,

откалиброванный в Международных единицах (МЕ).

Подготовка к испытаниям

Животные

Испытания проводят с использованием мышей линий B6D2F1, F1(CBA*C57BL) или линии Balb/c весом от 18-24 г. Использование беспородных мышей не позволяет получить необходимую точность результатов испытания.

Мышей предварительно взвешивают, если совокупность экспериментальных объектов однородна (разница не более, чем ± 0,5 г), их распределение в группы проводят случайным образом, животных распределяют в 6 клеток, по 8 особей в каждую. Если разница более, чем ± 0,5 г, но не более ± 2 г, животных вначале распределяют на группы, с колебаниями массы тела не более ± 0,5 г, помещая каждую группу в отдельную клетку. Затем из каждой весовой группы по одному животному помещают в одну из 6 клеток (по количеству вводимых растворов), пока в клетке не будет 8 особей. Животным в каждой из 6 клеток наносят определенную метку (пикриновой кислотой или выстриганием шерсти) в зависимости от дозы (табл. 1).

Таблица 1 - Пример нанесения метки (идентификации) животных

Наименование образца	МЕ/мл	Количество мышей	Место нанесения метки
Стандартный образец	80	8	Хвост
	40	8	Спина
	20	8	Голова
Испытуемый образец	80	8	Задняя нога
	40	8	Бок
	20	8	Передняя нога

Примечания:

Приготовление разведений стандартных и испытуемых образцов проводят в соответствии со следующей процедурой или в соответствии с указаниями, приведенными в нормативной документации. Готовят разведения стандартных и испытуемых образцов 80, 40 и 20 МЕ/мл.

Испытуемый раствор (a). Испытуемый препарат разводят фосфатно-альбуминовым забуференным физиологическим раствором pH 7,2 (1) до концентрации 80 МЕ/мл (ориентируясь на данные, указанные в сертификате анализа).

Испытуемый раствор (b). Смешивают равные объемы испытуемого раствора (a) и фосфатно-альбуминового забуференного физиологического раствора pH 7,2 (1) до получения концентрации 40 МЕ/мл.

Испытуемый раствор (c). Смешивают равные объемы испытуемого раствора (*b*) и фосфатно-альбуминового забуференного физиологического раствора pH 7,2 (1) до получения концентрации 20 МЕ/мл.

Стандартный раствор (a). Стандартный образец эритропоэтина восстанавливают в соответствии с инструкцией по применению, разводят в фосфатно-альбуминовом забуференном физиологическом растворе pH 7,2 (1) до получения концентрации 80 МЕ/мл.

Стандартный раствор (b). Смешивают равные объемы стандартного раствора (a) и фосфатно-альбуминового забуференного физиологического раствора pH 7,2 (1) до получения концентрации 40 МЕ/мл.

Стандартный раствор (c). Смешивают равные объемы стандартного раствора (*b*) и фосфатно-альбуминового забуференного физиологического раствора pH 7,2 (1) до получения концентрации 20 МЕ/мл.

Проведение испытания

Каждому животному в одной из 6 клеток подкожно вводят по 0,5 мл одной дозы (одно из разведений испытуемого препарата или стандартного образца). Затем животных распределяют в 8 новых клеток по одному животному с определенной дозой. Таким образом, в каждой клетке должны содержаться мыши, получившие все шесть растворов (3 испытуемых и 3 стандартных).

Отбор крови у лабораторных животных

Через 96 ч после введения препаратов у животных из ретроорбитального синуса отбирают образцы крови (200-300 мкл) в пробирки с

этилендиаминтетрауксусной кислотой дикалиевой или трикалиевой соли и определяют количество ретикулоцитов методом проточной цитофлуориметрии.

Учет результатов испытания с помощью проточного цитофлуориметра

Образцы крови окрашивают флуоресцентным красителем, например, 5 мкМ раствором акридинового оранжевого, в соотношении 1:500 (1000 мкл 5 мкМ раствора акридинового оранжевого и 2 мкл отобранной крови). Пробирки помещают в проточный цитофлуориметр и проводят подсчет ретикулоцитов.

Примечания:

Приготовление 0,001 М раствора акридинового оранжевого (флуоресцентный краситель). 3,7 мг акридинового оранжевого вносят в мерную колбу вместимостью 10 мл, растворяют в 0,9 % растворе натрия хлорида, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают. Раствор хранят в защищенном от света месте при температуре от 2 до 8 °С в течение 6 мес.

Приготовление 5 мкМ раствора акридинового оранжевого (флуоресцентный краситель). 0,5 мл 0,001 М раствора акридинового оранжевого вносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят до метки 0,9 % раствором натрия хлорида и перемешивают. Используют только свежеприготовленный раствор. Раствор используют свежеприготовленным, непосредственно перед использованием.

Процедура разведения образцов, используемые дозы и флуоресцентный краситель могут быть изменены, о чем должно быть указано в нормативной документации.

Агар. Смесь полисахаридов агарозы и агаропектина, получаемая путем экстракции из красных и бурых водорослей. Пористые пластины толщиной не более 20 мм или пленки толщиной не более 0,5 мм белого или светло-желтого цвета; допускается слегка сероватый оттенок.

Потеря в массе при высушивании не более 20 %.

Содержание тяжелых металлов не более 40 ppm Pb.

Агароза для хроматографии. [9012-36-6]. Линейный полисахарид, получаемый из агара. 4 % суспензия в воде набухших гранул диаметром от 60 до 140 мкм. Используют в гель-хроматографии для разделения белков с молекулярными массами от $6 \cdot 10^4$ до $20 \cdot 10^6$ и полисахаридов с молекулярными массами от $3 \cdot 10^3$ до $5 \cdot 10^6$.

Агароза поперечно-сшитая для хроматографии (1). [61970-08-9].

Получают из агарозы реакцией с 2,3-дибромпропанолом в сильно щелочной среде.

4 % суспензия в воде набухших гранул диаметром от 60 до 140 мкм. Используют в гель-хроматографии для разделения белков с молекулярными массами от $6 \cdot 10^4$ до $20 \cdot 10^6$ и полисахаридов с молекулярными массами от $3 \cdot 10^3$ до $5 \cdot 10^6$.

Агароза поперечно-сшитая для хроматографии (2). [65099-79-8].

Получают из агарозы реакцией с 2,3-дибромпропанолом в сильно щелочной среде.

4 % суспензия в воде набухших гранул диаметром от 60 до 140 мкм. Используют в гель-хроматографии для разделения белков с молекулярными массами от $7 \cdot 10^4$ до $40 \cdot 10^6$ и полисахаридов с молекулярными массами от $1 \cdot 10^5$ до $2 \cdot 10^7$.

Агароза для электрофореза. [9012-36-6].

Нейтральный линейный полисахарид, основной компонент которого получают из агара.

Порошок белого или почти белого цвета.

Практически нерастворима в холодной воде, очень мало растворима в горячей воде.

Агароза-ДЭАЭ для ионообменной хроматографии. [57407-08-6].

Поперечно-сшитая агароза с замещенными диэтиламиноэтильными группами в виде шарообразных гранул.

Агароза/поперечно-сшитый полиакриламид.

Агароза в поперечно-сшитой полиакриламидной матрице. Используют для разделения глобулярных белков с молекулярными массами от $2 \cdot 10^4$ до $35 \cdot 10^4$.

Аденозин. [58-61-7]. $C_{10}H_{13}N_5O_4$. (М.м. 267,24).

6-Амино-9-(β-D-рибофуранозил)-9*H*-пурин.

Кристаллический порошок белого цвета.

Мало растворим в воде, практически нерастворим в ацетоне, спирте 96 % и эфире; растворяется в разведённых растворах кислот.

Температура плавления. Около 234 °С.

Адипиновая кислота. [124-04-9]. $C_6H_{10}O_4$. (М.м. 146,14).

Гександиовая кислота.

Кристаллы в виде призм.

Легко растворима в метаноле, растворима в ацетоне, практически нерастворима в петролейном эфире.

Температура плавления. Около 152 °С.

Азометин Н. [5941-07-1]. $C_{17}H_{12}NNaO_8S_2$. (М.м. 445,4).

4-Гидрокси-5-{[(2-гидроксифенил)метилиден]амино}нафталин-2,7-дисульфонат натрия (1:1).

Бесцветный или белый кристаллический порошок.

Растворим в воде и спирте 96 %.

Азометин Н раствор.

0,45 г азометина Н и 1 г аскорбиновой кислоты растворяют в воде при слабом нагревании и доводят объём раствора тем же растворителем до 100 мл.

Азот. [7727-37-9]. N_2. (М.м. 28,01). Азот.

Азот промытый и высушенный.

Азот особой чистоты. [7727-37-9].

Содержит не менее 99,999 % (о/о) N_2.

Углерода монооксид. Не более 5 ppm.

Кислород. Не более 5 ppm.

Азот для хроматографии. [7727-37-9]. Содержит не менее 99,95 % (о/о) N_2.

Азот, свободный от кислорода. [7727-37-9]. Азот очищают от кислорода пропусканием через раствор пирогаллола щелочной.

Азота закись. [10024-97-2]. N_2O. (М.м. 44,01).

Оксид диазота.

Содержит не менее 99,99 % (о/о) N_2O.

Азота монооксид. Не более 1 ppm.

Углерода монооксид. Не более 1 ppm.

Азота монооксид. [10102-43-9]. NO. (М.м. 30,01).

Оксид азота(II).

Содержит не менее 98,0 % (о/о) NO.

Азотная кислота концентрированная. [7697-37-2]. HNO_3. (М.м. 63,01).

Азотная кислота.

Содержит не менее 63,0 % (м/м) и не более 70,0 % (м/м) HNO_3.

Прозрачная, бесцветная или почти бесцветная жидкость, смешивается с водой.

d_{20}^{20}. От 1,384 до 1,416.

Раствор 10 г/л является сильной кислотой и дает реакцию на нитраты.

Прозрачность. Азотная кислота должна быть прозрачной.

Цветность. Окраска азотной кислоты должна быть не интенсивнее эталона Y_6.

Хлориды. Не более 0,00005 % (0,5 ppm). К 5 г азотной кислоты концентрированной прибавляют 10 мл воды и 0,3 мл 1,7 % раствора серебра нитрата, выдерживают в течение 2 мин в защищенном от света месте. Полученный раствор должен выдерживать испытание на хлориды. Эталон готовят с использованием смеси 13 мл воды, 0,5 мл азотной кислоты концентрированной, 0,5 мл эталонного раствора хлорида (5 ppm Cl) и 0,3 мл 1,7 % раствора серебра нитрата.

Сульфаты. Не более 0,0002 % (2 ppm). К 10 г азотной кислоты концентрированной прибавляют 0,2 г натрия карбоната и выпаривают досуха; остаток растворяют в 15 мл воды дистиллированной. Полученный раствор должен выдерживать испытание на сульфаты. Эталон готовят с использованием 2 мл эталонного раствора сульфата (10 ppm SO_4) и 13 мл воды дистиллированной.

Мышьяк (метод А). Не более 0,000002 % (0,02 ppm). К 50 г азотной кислоты концентрированной прибавляют 0,5 мл серной кислоты концентрированной и осторожно выпаривают до появления белых паров; к остатку прибавляют 1 мл 10 % раствора гидроксиламина гидрохлорида и доводят водой до 2 мл. Полученный раствор должен выдерживать испытание на мышьяк. Эталон готовят с использованием 1,0 мл эталонного раствора мышьяка (1 ppm As).

Тяжелые металлы. Не более 0,0002 % (2 ppm). 10 мл раствора, приготовленного для испытания на железо, доводят водой до 20 мл. 12 мл полученного раствора должны выдерживать испытание на тяжелые металлы. Эталон готовят с использованием эталонного раствора свинца (2 ppm Pb).

Железо. Не более 0,0001 % (1 ppm). Осадок, полученный при испытании на сульфатную золу, растворяют в 1 мл хлористоводородной кислоты разведённой 7,3 % и доводят объём раствора водой до 50 мл. 5 мл полученного раствора доводят водой до объёма 10 мл. Полученный раствор должен выдерживать испытание на железо.

Сульфатная зола. Не более 0,001 %. 100 г кислоты азотной концентрированной осторожно выпаривают досуха; остаток смачивают несколькими каплями серной кислоты концентрированной и нагревают до бледно-красного цвета.

Количественное определение. К 1,50 г кислоты азотной концентрированной прибавляют около 50 мл воды и титруют 1 М раствором натрия гидроксида, используя в качестве индикатора 0,1 мл 0,05 % раствора метилового красного.

1 мл 1 М раствора натрия гидроксида соответствует 63,0 мг HNO_3.

Хранят в защищенном от света месте.

Азотная кислота, свободная от свинца.

Азотная кислота концентрированная должна выдерживать следующее дополнительное испытание.

К 100 г азотной кислоты концентрированной прибавляют 0,1 г натрия карбоната безводного и выпаривают досуха; остаток растворяют в воде при слабом нагревании и доводят объём раствора тем же растворителем до 50,0 мл. Содержание свинца определяют методом атомно-абсорбционной спектрометрии. Интенсивность поглощения измеряют при длине волны 283,3 нм или 217,0 нм, используя в качестве источника излучения лампу с полым свинцовым катодом и воздушно-ацетиленовое пламя. Не более 0,00001 % (0,1 ppm Pb).

Азотная кислота, свободная от свинца и кадмия.

Азотная кислота концентрированная должна выдерживать следующие дополнительные испытания.

Испытуемый раствор. К 100 г азотной кислоты концентрированной прибавляют 0,1 г натрия карбоната безводного, выпаривают досуха; остаток

растворяют в воде при слабом нагревании и доводят объём раствора тем же растворителем до 50,0 мл.

Кадмий. Не более 0,00001 % (0,1 ppm). Содержание кадмия определяют методом атомно-абсорбционной спектрометрии. Интенсивность поглощения измеряют при длине волны 228,8 нм, используя в качестве источника излучения лампу с полым кадмиевым катодом и воздушно-ацетиленовое или воздушно-пропановое пламя.

Свинец. Не более 0,00001 % (0,1 ppm). Содержание свинца определяют методом атомно-абсорционной спектрометрии. Интенсивность поглощения измеряют при длине волны 283,3 нм или 217,0 нм, используя лампу с полым свинцовым катодом и воздушно-ацетиленовое пламя.

Азотная кислота. Содержит 31 – 34 % HNO_3.

Смешивают 1 г азотной кислоты концентрированной и 1 г воды.

Плотность. 1,186 – 1,210.

Азотная кислота разведённая 20 %. Содержит около 200 г/л HNO_3.

32 г азотной кислоты концентрированной доводят водой до 100 мл.

Азотная кислота разведённая 16 %. Содержит азотной кислоты 15,5 – 17,0 %.

Смешивают 1 г азотной кислоты и 1 г воды.

Плотность. 1,087 – 1,096.

Азотная кислота разведённая 12,5 %. Содержит около 125 г/л HNO_3.

20 г азотной кислоты концентрированной доводят водой до 100 мл.

Азотная кислота разведённая 4 %. Содержит около 40 г/л HNO_3.

20 г азотной кислоты разведённой 16 % доводят водой до 100 мл.

Азотная кислота дымящая.

Прозрачная жидкость, слегка желтоватого цвета, дымящая на воздухе.

d_{20}^{20}. Около 1,5.

Азотной кислоты ацетоновый раствор 3 %.

4,8 г азотной кислоты концентрированной доводят ацетоном до 100 мл.

Азотной кислоты 7,5 М раствор.

525 мл азотной кислоты концентрированной доводят водой до 1000,0 мл.

Азотной кислоты 2 М раствор.

140 мл азотной кислоты концентрированной доводят водой до 1000,0 мл.

Азотной кислоты 0,5 М раствор.

35 мл азотной кислоты концентрированной доводят водой до 1000,0 мл.

Азотной кислоты 0,1 М раствор.

9,7 г азотной кислоты концентрированной доводят водой до 1000,0 мл.

Акриламид. [79-06-1]. C_3H_5NO. (М.м. 71,08). Проп-2-енамид.

Бесцветные или белого цвета хлопья или кристаллический порошок белого или почти белого цвета.

Очень легко растворим в воде и метаноле, легко растворим в этаноле.

Температура плавления. Около 84 °С.

Акриламид-бисакриламида (29:1) 30 % раствор.

290 г акриламида и 10 г метиленбисакриламида растворяют в 1000,0 мл воды и фильтруют.

Акриламид-бисакриламид (32,3:1) 30 % раствор.

291 г акриламида и 9 г метиленбисакриламида растворяют в 1000,0 мл воды и фильтруют.

Акриламид-бисакриламида (36,5:1) 30 % раствор.

292 г акриламида и 8 г метиленбисакриламида растворяют в 1000,0 мл воды и фильтруют.

Акриловая кислота. [79-10-7]. $C_3H_4O_2$. (М.м. 72,06). Проп-2-еновая кислота.

Содержит не менее 99 % $C_3H_4O_2$. Стабилизирована 0,02 % раствором монометилового эфира гидрохинона.

Бесцветная или слегка желтоватая едкая жидкость.

Смешивается с водой, спиртом 96 % и эфиром.

Легко полимеризуется в присутствии кислорода.

d_{20}^{20}. Около 1,05.

n_D^{20}. Около 1,421.

Температура кипения. Около 141 °С.

Температура плавления. От 12 до 15 °С.

β-Аланин. [107-95-9]. $C_3H_7NO_2$. (М.м. 89,09).

3-Аминопропановая кислота.

Содержит не менее 99 % $C_3H_7NO_2$.

Кристаллический порошок белого цвета.

Легко растворима в воде, мало растворима в спирте 96 %, практически нерастворима в ацетоне и эфире.

Температура плавления. Около 200 °С с разложением.

Алеуритиновая кислота. [533-87-9]. $C_{16}H_{32}O_5$. (М.м. 304,42).

rac-(9*R*,10*S*)-9,10,16-Тригидроксигексадекановая кислота.

Порошок белого цвета, жирный на ощупь.

Растворима в метаноле.

Температура плавления. Около 101 °С.

Ализарин S. [130-22-3]. $C_{14}H_7NaO_7S \cdot H_2O$. (М.м. 360,27).

1,2-Дигидрокси-9,10-диоксо-9,10-дигидроантрацен-3-сульфонат натрия, моногидрат.

Порошок оранжево-желтого цвета.

Легко растворим в воде и спирте 96 %, практически нерастворим в бензоле, хлороформе и эфире.

Ализариновый красный С. См. **Ализарин S**.

Ализарина S раствор 0,1 %. Раствор 1 г/л.

Испытание на чувствительность. Реактив изменяет окраску от желтой до оранжево-красной при установлении титра 0,05 М раствора бария перхлората.

Переход окраски от желтой до фиолетовой в интервале pH 3,7 – 5,2.

Ализаринкомплексон. [3952-78-1]. $C_{19}H_{15}NO_8$. (М.м. 385,32).

2,2'-{[(3,4-Дигидрокси-9,10-диоксо-9,10-дигидроантрацен-2-ил)метил]нитрило}диуксусная кислота.

Мелкокристаллический порошок от светлого коричневато-желтого до оранжево-коричневого цвета.

Практически нерастворима в воде, растворима в растворах гидроксидов щелочных металлов.

Температура плавления. Около 185 °С.

Потеря в массе при высушивании. Не более 10,0 %. Определение проводят из 1,0 г.

Ализаринкомплексона раствор.

0,193 г ализаринкомплексона растворяют в 6 мл свежеприготовленного 1 М раствора натрия гидроксида, прибавляют 750 мл воды, 25 мл сукцинатного буферного раствора pH 4,6 и по каплям 0,5 М раствор хлористоводородной кислоты до изменения окраски раствора от фиолетово-красной до желтой (pH от 4,5 до 5,0), затем прибавляют 100 мл ацетона и доводят объём раствора водой до 1000 мл.

Ализаринкомплексона реактив.

Раствор I. 0,36 г церия(III) нитрата растворяют в воде и доводят объём раствора тем же растворителем до 50 мл.

Раствор II. 0,7 г ализаринкомплексона суспендируют в 50 мл воды, прибавляют до растворения около 0,25 мл раствора аммиака концентрированного, затем прибавляют 0,25 мл уксусной кислоты ледяной и доводят объём раствора водой до 100 мл.

Раствор III. 6,0 г натрия ацетата растворяют в 50 мл воды, прибавляют 11,5 мл уксусной кислоты ледяной и доводят объём раствора водой до 100 мл.

К 33 мл ацетона прибавляют 6,8 мл раствора III, 1,0 мл раствора II, 1,0 мл раствора I и доводят объём полученного раствора водой до 50 мл.

Испытание на чувствительность. К 1,0 мл эталонного раствора фторида (10 ppm фторид-иона) прибавляют 19,0 мл воды и 5,0 мл реактива ализаринкомплексона. Через 20 мин должно появиться голубое окрашивание. Срок годности раствора 5 сут.

Ализариновый желтый. [1718-34-9]. $C_{13}H_8N_3NaO_5$. (М.м. 309,21).

2-Гидрокси-5-[(4-нитрофенил)диазенил]бензоат натрия.

Кристаллический порошок светло-коричневого, темно-коричневого или красно-коричневого цвета.

Мало растворим в воде и спирте 96 %, легко растворим при нагревании.

Переход окраски раствора от светло-желтой к красно-оранжевой в интервале pH 10,0 – 12,0.

Раствор индикатора. 0,1 % раствор. Растворение проводят при нагревании.

Альфадекс. [10016-20-3]. $C_{36}H_{60}O_{30}$. (М.м. 972,8).

Циклогексакис-(1→4)-(α-D-глюкопиранозил)

Содержит не менее 98 % $C_{36}H_{60}O_{30}$.

Растворим в воде.

Температура плавления. Около 278° (с разл.).

Алюминий. [7429-90-5]. Al. (А.м. 26,98). Мягкий, ковкий металл белого с голубоватым оттенком цвета в виде брусков, листов, порошка, ленты или проволоки. На воздухе образуется окисная пленка, которая защищает металл от коррозии.

Аналитической чистоты.

Алюминия-калия сульфат. [7784-24-9]. $AlK(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$ (М.м. 474,4).

Бис(сульфат) алюминия-калия, додекагидрат.

Содержит не менее 99,0 % и не более 100,5 % $AlK(SO_4)_2 \cdot 12\ H_2O$.

Гранулированный порошок или бесцветная кристаллическая масса.

Легко растворим в воде, очень легко растворим в кипящей воде, растворим в глицерине, практически нерастворим в этаноле.

Алюминия нитрат. [7784-27-2]. $Al(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$. (М.м. 375,13).

Нитрат алюминия, нонагидрат.

Кристаллы, расплывающиеся на воздухе.

Очень легко растворим в воде и спирте 96 %, очень мало растворим в ацетоне.

Хранят в воздухонепроницаемой упаковке.

Алюминия оксид безводный. [1344-28-1]. Al_2O_3. (М.м. 101,96). Оксид алюминия.

Алюминия оксид, состоящий из γ-Al_2O_3, обезвоженный и активированный нагреванием. Размер частиц от 75 до 150 мкм.

Алюминия оксид основной.

Порошок белого цвета.

Алюминия оксид безводный основной формы пригоден для колоночной хроматографии.

pH. От 9,0 до 10,0 (суспензия, полученная встряхиванием 1 г с 10 мл воды в течение 5 мин).

Алюминия оксид нейтральный.

Гранулированный порошок белого цвета.

Обменная емкость. 1,00 г прокаина гидрохлорида растворяют в спирте (90 %, о/о) и доводят объём раствора тем же растворителем до 100 мл. 20,0 мл полученного раствора и 5,0 г испытуемого реактива помещают в колбу вместимостью 100 мл с притертой стеклянной пробкой, выдерживают в течение 15 мин, периодически встряхивая, и фильтруют. К 10,0 мл фильтрата прибавляют 10 мл воды, 0,05 мл 0,05 % раствора бромфенолового синего и титруют 0,1 М раствором хлористоводородной кислоты до зеленого окрашивания. Цвет раствора должен измениться при прибавлении не более 1,4 мл 0,1 М раствора хлористоводородной кислоты.

Водорастворимые вещества. Не более 0,2 %. Используют хроматографическую колонку с внутренним диаметром 1 см, длиной 40 см, нижний конец которой сужен до диаметра от 2 до 3 мм и снабжен пористым стеклянным фильтром (100) или хлопковым тампоном выше суженной части. Колонку заполняют 10,0 г испытуемого реактива и 25 мл воды, элюируют водой до получения 20 мл прозрачного элюата, который выпаривают и сушат при температуре 150 °С; масса остатка не должна превышать 20 мг.

Раствор S. Остаток, полученный в испытании «Водорастворимые вещества», растворяют при нагревании в воде, фильтруют и доводят объём фильтрата водой до 100 мл.

Хлориды. Не более 0,05 %. 1 мл раствора S доводят водой до 15 мл. Полученный раствор должен выдерживать испытание на хлориды.

Сульфаты. Не более 0,1 %. 1 мл раствора S доводят водой до 15 мл. Полученный раствор должен выдерживать испытание на сульфаты. Эталон готовят с использованием 10 мл эталонного раствора сульфата (10 ppm сульфат-иона).

Хроматографическая разделяющая способность. Хроматографическую колонку, описанную в испытании «Водорастворимые вещества», заполняют испытуемым реактивом до высоты 5 см. Через колонку пропускают 5 мл раствора азобензола и 5 мл метоксиазобензола, затем промывают 20 мл смеси растворителей бензол—петролейный эфир 1:4. В верхней части колонки образуется слой метоксиазобензола ярко-желтого цвета толщиной от 3 до 5 мм, а ниже его наблюдается слой азобензола бледно-желтого цвета толщиной 2 см.

Алюминия оксид нейтральный для хроматографии

Порошок белого цвета.

Алюминия оксид безводный, нейтральный, для колоночной хроматографии.

При необходимости указывается размер частиц, активность и другие параметры.

Алюминия хлорид. [7784-13-6]. $AlCl_3 \cdot 6H_2O$. (М.м. 241,43).

Алюминия хлорид, гексагидрат. Содержит не менее 98,0 % $AlCl_3 \cdot 6H_2O$.

Кристаллический порошок от белого до слегка желтоватого цвета, гигроскопичен.

Легко растворим в воде и спирте 96 %, растворим в эфире.

Хранят в воздухонепроницаемой упаковке.

Алюминия хлорида раствор.

65,0 г алюминия хлорида растворяют в воде и доводят объём раствора тем же растворителем до 100 мл. Прибавляют 0,5 г угля активированного, перемешивают в течение 10 мин и фильтруют. К фильтрату при непрерывном перемешивании прибавляют достаточное количество 1 %

раствора натрия гидроксида (около 60 мл) до получения раствора с pH около 1,5.

Алюминия хлорида раствор 10 %.

10 г алюминия хлорида растворяют в 40 мл воды в мерной колбе вместимостью 100 мл и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

Алюминия хлорида раствор 10 % в спирте 96 %.

10 г алюминия хлорида растворяют в 40 мл спирта 96 % в мерной колбе вместимостью 100 мл и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

Алюминия хлорида раствор 5 % в спирте 96 %.

5 г алюминия хлорида растворяют в 40 мл спирта 96 % в мерной колбе вместимостью 100 мл и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

Алюминия хлорида раствор 5 % в спирте 70 %.

5,0 г алюминия хлорида помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 50 мл спирта 70 % и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

Алюминия хлорида раствор 4 % в спирте 96 %. 4,0 г алюминия хлорида помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 40 мл спирта 96 % и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

Алюминия хлорида раствор 3 % в спирте 96 %.

3 г алюминия хлорида растворяют в 40 мл спирта 96 % в мерной колбе вместимостью 100 мл и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

Алюминия хлорида раствор 3 % в спирте 70 %.

3 г алюминия хлорида растворяют в 40 мл спирта 70 % в мерной колбе вместимостью 100 мл и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

Алюминия хлорида раствор 2 % в спирте 96 %.

2 г алюминия хлорида растворяют в 40 мл спирта 96 % в мерной колбе вместимостью 100 мл и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

Алюминия хлорида раствор 2 % в спирте 70 %.

2,0 г алюминия хлорида помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 50 мл спирта 70 % и доводят объём раствора тем же растворителем до метки

Алюминия хлорида раствор 2 % в спирте 60 %.

2,0 г алюминия хлорида помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 50 мл спирта 60 % и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

Алюминия хлорида раствор 2 % в спирте 50 %.

2,0 г алюминия хлорида помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 50 мл спирта 50 % и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

Алюминия хлорида раствор 1 % в спирте 96 %.

1 г алюминия хлорида растворяют в 40 мл спирта 96 % в мерной колбе вместимостью 100 мл и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

Алюминия хлорида реактив.

2,0 г алюминия хлорида растворяют в 100 мл 5 % (о/о) раствора уксусной кислоты ледяной в метаноле.

Алюминия хлорида спиртовой раствор (около 0,05 М).

12,5 г алюминия хлорида растворяют в 100 мл спирта 96 % и доводят объём раствора тем же растворителем до 1000,0 мл.

Проверка титра не требуется.

Алюмокалиевые квасцы. См. **Алюминия-калия сульфат**.

Амидо-черный 10В. [1064-48-8]. $C_{22}H_{14}N_6Na_2O_9S_2$. (М.м. 616,5). 4-Амино-5-гидрокси-3-[(4-нитрофенил)диазенил]-6-(фенилдиазенил)нафталин-2,7-дисульфонат динатрия.

Порошок от темно-коричневого до черного цвета.

Умеренно растворим в воде; растворим в спирте 96 %.

Амидо-черного 10В раствор 0,5 %.

Раствор 5 г/л амидо-черного 10В в смеси растворителей 30 % уксусной кислоты – метанола 10:90.

Амилацетат. [628-63-7]. $C_7H_{14}O_2$. (М.м. 130,18).

Пентилацетат.

Бесцветная прозрачная жидкость с фруктовым запахом.

Хорошо смешивается с этанолом и эфиром; смешивается с водой в соотношении 0,18:100.

d_{20}^{20}. 0,879.

Температура кипения. Около 148 °С.

***н*-Амиловый спирт**. См. **Пентанол**.

***трет*-Амиловый спирт**. См. ***трет*-Пентиловый спирт**.

Аминоазобензол. [60-09-3]. $C_{12}H_{11}N_3$. (М.м. 197,24).

4-(Фенилдиазенил)анилин.

Игольчатые кристаллы коричневато-желтого с голубоватым оттенком цвета.

Мало растворим в воде, легко растворим в спирте 96 % и эфире.

Температура плавления. Около 128 °С.

4-Аминоантипирин. [83-07-8]. $C_{11}H_{13}N_3O$. (М.м. 203,24).

4-Амино-1,5-диметил-2-фенил-1,2-дигидро-3*H*-пиразол-3-он.

Игольчатые кристаллы или порошок светло-желтого цвета.

Умеренно растворим в воде, легко растворим в спирте 96 %, мало растворим в эфире.

Температура плавления. Около 108 °С.

2-Аминобензойная кислота. [118-92-3]. $C_7H_7NO_2$. (М.м. 137,14).

2-Аминобензойная кислота.

Кристаллический порошок от белого до бледно-желтого цвета.

Умеренно растворима в холодной воде, легко растворима в горячей воде, спирте 96 %, эфире и глицерине.

Растворы в спирте 96 % или эфире и, в особенности в глицерине, обнаруживают фиолетовую флуоресценцию.

Температура плавления. Около 145 °С.

3-Аминобензойная кислота. [99-05-8]. $C_7H_7NO_2$. (М.м. 137,14).

3-Аминобензойная кислота.

Кристаллический порошок от белого до бледно-желтого цвета.

Температура плавления. От 178 до 180 °С.

4-Аминобензойная кислота. [150-13-0]. $C_7H_7NO_2$. (М.м. 137,14).

4-Аминобензойная кислота.

Кристаллический порошок белого цвета.

Мало растворима в воде, легко растворима в спирте 96 %, практически нерастворима в петролейном эфире.

Температура плавления. Около 187 °С.

Хранят в защищенном от света месте.

4-Аминобензойной кислоты раствор.

1 г 4-аминобензойной кислоты растворяют в смеси 18 мл уксусной кислоты безводной, 20 мл воды и 1 мл фосфорной кислоты концентрированной.

Непосредственно перед использованием полученный раствор смешивают с ацетоном в соотношении 2:3.

Аминобутанол. [5856-63-3]. $C_4H_{11}NO$. (М.м. 89,14). (2*R*)-2-Аминобутан-1-ол.

Маслянистая жидкость.

Смешивается с водой, растворим в спирте 96 %.

d_{20}^{20}. Около 0,94.

n_D^{20}. Около 1,453.

Температура кипения. Около 180 °С.

6-Аминогексановая кислота. [60-32-2]. $C_6H_{13}NO_2$. (М.м. 131,17).

6-Аминогексановая кислота.

Бесцветные кристаллы.

Легко растворима в воде, умеренно растворима в метаноле, практически нерастворима в этаноле.

Температура плавления. Около 205 °С.

2-Аминогептан. [123-82-0].$C_7H_{17}N$. (М.м. 115,22.).

(2*RS*)-Гептан-2-амин.

Прозрачная бесцветная или слегка желтоватая жидкость.

d_4^{20}. Около 0,766.

n_D^{20}. Около 1,418.

Температура кипения. 142 – 144 °С.

Аминогидроксинафталинсульфоновая кислота. [116-63-2]. $C_{10}H_9NO_4S$. (М.м. 239,24). 4-Амино-3-гидроксинафталин-1-сульфоновая кислота.

Игольчатые кристаллы белого или серого цвета, под действием света приобретают розовый цвет, в особенности влажные.

Практически нерастворима в воде, спирте 96 % и эфире, растворима в растворах гидроксидов щелочных металлов и горячих растворах натрия метабисульфита.

Хранят в защищенном от света месте.

Аминогидроксинафталинсульфоновой кислоты раствор.

Смешивают 5,0 г натрия сульфита безводного, 94,3 г натрия гидросульфита и 0,7 г аминогидроксинафталинсульфоновой кислоты. 1,5 г полученной смеси растворяют в воде и доводят объём раствора тем же растворителем до 10,0 мл.

Срок годности раствора 1 сут.

Аминогиппуровая кислота. [61-78-9]. $C_9H_{10}N_2O_3$. (М.м. 194,19).

(4-Аминобензамидо)уксусная кислота.

Порошок белого или почти белого цвета.

Умеренно растворима в воде, растворима в спирте 96 %, очень мало растворима в эфире.

Температура плавления. Около 200 °С.

Аминогиппуровой кислоты реактив.

3,0 г фталевой кислоты и 0,3 г аминогиппуровой кислоты растворяют в спирте 96 % и доводят объём раствора тем же растворителем до 100 мл.

Аминометилализариндиуксусная кислота. См. **Ализаринкомплексон**.

Аминометилализариндиуксусной кислоты раствор.

См. **Ализаринкомплексона раствор**.

Аминометилализариндиуксусной кислоты реактив.

См. **Ализаринкомплексона реактив**.

4-Амино-3-гидроксинафталин-1-сульфоновая кислота.

См. **Аминогидроксинафталинсульфоновая кислота**.

2-Амино-*N*-метил-*N*-циклогексилбензиламин. [57365-08-9]. $C_{14}H_{22}N_2$. (М.м. 218,34).

2-{[Метил(циклогексил)амино]метил}анилин.

Содержит не менее 98 % $C_{14}H_{22}N_2$.

Температура плавления. От 44 до 47 °С.

8-Аминонафталин-2-сульфокислота. См. **1-Нафтиламин-7-сульфоновая кислота.**

Аминонитробензофенон. [1775-95-7]. $C_{13}H_{10}N_2O_3$. (М.м. 242,23).

2-Бензоил-5-нитроанилин.

Кристаллический порошок желтого цвета.

Практически нерастворим в воде, растворим в тетрагидрофуране, мало растворим в метаноле.

Температура плавления. Около 160 °С.

$A_{1см}^{1\%}$. От 690 до 720. Определение проводят при длине волны 233 нм, используя раствор 0,01 г/л в метаноле.

Аминопиразолон. См. **4-Аминоантипирин**.

Аминопиразолона раствор 0,1 %. Раствор 1 г/л в буферном растворе pH 9,0.

Аминополиэфир. [23978-09-8]. $C_{18}H_{36}N_2O_6$. (М.м. 376,49).

4,7,13,16,21,24-Гексаокса-1,10-диазабицикло[8.8.8]гексакозан.

Бесцветные кристаллы или белый кристаллический порошок.

Нерастворим в воде, мало растворим в спирте 96 %.

Температура плавления. От 70 до 73 °С.

3-Аминопропанол. [156-87-6]. C_3H_9NO. (М.м. 75,11). 3-Аминопропан-1-ол.

Прозрачная, бесцветная, вязкая жидкость.

d_{20}^{20}. Около 0,99.

n_D^{20}. Около 1,461.

Температура плавления. Около 11 °С.

3-Аминопропановая кислота. См. **β-Аланин**.

Аминоуксусная кислота. См. **Глицин**.

Аминоуксусная буферная смесь.

Растворяют в воде 8,4 г натрия гидрокарбоната, 10,0 г калия гидрокарбоната, 7,5 г аминоуксусной кислоты, 4,0 мл раствора аммиака концентрированного и доводят объём раствора водой до 100,0 мл; pH около 8,3.

2-Аминофенол. [95-55-6]. C_6H_7NO. (М.м. 109,13). 2-Аминофенол.

Белый или слегка окрашенный кристаллический порошок.

Умеренно растворим в воде, растворим в этаноле.

Температура плавления. От 170 до 175 °С.

Хранят в защищенном от света месте.

3-Аминофенол. [591-27-5]. C_6H_7NO. (М.м. 109,13). 3-Аминофенол.

Белый или слегка окрашенный кристаллический порошок.

Умеренно растворим в воде, растворим в этаноле.

Температура плавления. От 120 до 124 °С с разложением.

Температура кипения. Около 164 °С при 11 мм. рт. ст.

Хранят в защищенном от света месте.

4-Аминофенол. [123-30-8]. C_6H_7NO. (М.м. 109,13). 4-Аминофенол.

Белый или слегка окрашенный кристаллический порошок.

Умеренно растворим в воде, растворим в этаноле.

Температура плавления. Около 186 °С с разложением.

Хранят в защищенном от света месте.

4-Аминофолиевая кислота. [54-62-6]. $C_{19}H_{20}N_8O_5$. (М.м. 440,4).

(2*S*)-2-(4-{[(2,4-Диаминоптеридин-6-ил)метил]амино}бензамидо)пентандиовая кислота.

Жёлтый порошок.

Температура плавления. Около 230 °С.

Аминохлорбензофенон. [719-59-5]. $C_{13}H_{10}ClNO$. (М.м. 231,68).

2-Бензоил-4-хлоранилин.

Кристаллический порошок желтого цвета.

Практически нерастворим в воде, легко растворим в ацетоне, растворим в спирте 96 %.

Температура плавления. Около 97 °С.

Хранят в защищенном от света месте.

Аммиак. [7664-41-7]. NH_3 (М.м. 17,03).

Аммиак водный. См. **Аммиака раствор концентрированный 25 %**.

Аммиака раствор.

Содержит не менее 17 % (170 г/л) и не более 19 % (190 г/л) NH_3.

68 г раствора аммиака концентрированного 25 % доводят водой до 100,0 мл.

d_{20}^{20}. От 0,931 до 0,934.

Аммиака раствор, используемый в испытании на предельное содержание железа, должен выдерживать следующее дополнительное требование: 5 мл раствора аммиака выпаривают при температуре 100 °С досуха. К сухому остатку прибавляют 10 мл воды, 2 мл 20 % раствора лимонной кислоты, 0,1 мл тиогликолевой кислоты и раствора аммиака до щелочной реакции, доводят объём полученного раствора водой до 20,0 мл. Раствор не должен окрашиваться в розовый цвет.

Хранят при температуре не выше 20 °С, защищая от углерода диоксида.

Аммиака раствор концентрированный 32 %.

Содержит не менее 32 % (м/м) NH_3.

Прозрачная, бесцветная жидкость.

d_{20}^{20}. От 0,883 до 0,889.

Количественное определение. 50,0 мл 1 М раствора хлористоводородной кислоты помещают в колбу с притертой пробкой, точно взвешивают, прибавляют 2 мл раствора аммиака концентрированного и снова взвешивают.

Титруют 1 М раствором натрия гидроксида, используя в качестве индикатора 0,5 мл смешанного раствора метилового красного.

1 мл 1 М раствора хлористоводородной кислоты соответствует 17,03 мг NH_3.

Хранят при температуре не выше 20 °С, защищая от углерода диоксида.

Аммиака раствор концентрированный 25 %.

Содержит от 25 до 28 % (м/м) NH_3.

Бесцветная прозрачная жидкость с характерным острым (резким) запахом. Обращаться с осторожностью.

Аммиака раствор 17 %. См. **Аммиака раствор**.

Аммиака раствор 10 %.

Содержит не менее 10 % (100 г/л) и не более 11 % (110 г/л) NH_3.

40 г раствора аммиака концентрированного 25 % доводят водой до 100,0 мл.

Аммиака раствор 5 %.

500 мл 10 % раствора аммиака доводят водой до 1000,0 мл.

Аммиака раствор 1 %.

4 г раствора аммиака концентрированного 25 % доводят водой до 100,0 мл.

Аммиака раствор разведённый 3,4 %.

Содержит не менее 3,3 % (33 г/л) и не более 3,6 % (36 г/л) NH_3.

13 г раствора аммиака концентрированного 25 % доводят водой до 100,0 мл.

Аммиака раствор разведённый 0,18 %.

Содержит не менее 0,16 % (1,6 г/л) и не более 0,18 % (1,8 г/л) NH_3.

0,7 г раствора аммиака концентрированного 25 % доводят водой до 100,0 мл.

Аммиака раствор 13,5 М.

920,0 мл аммиака водного доводят водой до 1000,0 мл.

Аммиака раствор 10 М.

681,2 мл аммиака водного доводят водой до 1000,0 мл.

Аммиака раствор 6 М.

408,7 мл аммиака водного доводят водой до 1000,0 мл.

Аммиака водно-спиртовой раствор.

1,0 мл раствора аммиака концентрированного 25 % смешивают с 9,0 мл спирта 96 %.

Аммиачный буферный раствор. См. **Аммония хлорида буферный раствор pH 10,0** (ОФС "Буферные растворы").

Аммоний азотнокислый. См. **Аммония нитрат**.

Аммоний пурпурнокислый. [3051-09-0]. $C_8H_8N_6O_6 \cdot H_2O$. (М.м. 302,20).

2,6-Диоксо-5-{[2,4,6-триоксотетрагидропиримидин-5(2*H*)-илиден]амино}-1,2,3,6-тетрагидропиримидин-4-олат аммония, моногидрат.

Мелкокристаллический порошок пурпурно-красного или красно-коричневого цвета с характерным зеленоватым металлическим блеском.

Мало растворим в воде.

При pH > 11,0 раствор имеет фиолетовую окраску, а его комплекс с ионом кальция в тех же условиях оранжевого цвета.

Переход окраски при прямом титровании ионов кальция от оранжевой к фиолетовой.

Индикаторная смесь. 0,25 г индикатора и 25 г натрия хлорида растирают в ступке и перемешивают.

Аммония ацетат. [631-61-8]. $C_2H_7NO_2$. (М.м. 77,08). Ацетат аммония. Бесцветные кристаллы, очень легко расплывающиеся на воздухе.

Очень легко растворим в воде и спирте 96 %.

Хранят в воздухонепроницаемой упаковке.

Аммония ацетата раствор 15 %.

150 г аммония ацетата растворяют в воде, прибавляют 3 мл уксусной кислоты ледяной и доводят объём раствора водой до 1000 мл.

Срок годности 7 сут.

Аммония ацетата раствор 0,48 %.

3,2 мл 15 % раствора аммония ацетата доводят водой до 100 мл.

Используют свежеприготовленным.

Аммония ацетата насыщенный раствор.

Растворяют достаточное количество аммония ацетата в воде до получения раствора, содержащего не менее 61,5 % аммония ацетата.

Аммония ацетата насыщенный раствор, нейтрализованный раствором натрия гидроксида.

Аммония ацетата насыщенный раствор нейтрализуют сначала 30 % раствором натрия гидроксида до розового окрашивания по фенолфталеину, затем избыток натрия гидроксида нейтрализуют насыщенным раствором аммония ацетата до слабо-розового окрашивания.

Аммония ванадат. [7803-55-6]. NH_4VO_3. (М.м. 116,98).

Триоксованадат(V) аммония.

Кристаллический порошок от белого до слегка желтоватого цвета.

Мало растворим в воде, растворим в 10 % растворе аммиака.

Аммония ванадата раствор 1,2 %.

1,2 г аммония ванадата растворяют в 95 мл воды и доводят объём раствора серной кислотой концентрированной до 100,0 мл.

Аммония ванадата раствор 0,5 % в серной кислоте концентрированной.

0,05 г аммония ванадата растворяют в 10 мл серной кислоты концентрированной.

Аммония гидрокарбонат. [1066-33-7]. NH_4HCO_3. (М.м. 79,06).

Гидрокарбонат аммония.

Содержит не менее 99 % NH_4HCO_3.

Бесцветные кристаллы или белый кристаллический порошок.

Легко растворим в холодной воде, реагирует в горячей воде, практически нерастворим в спирте 96 % и ацетоне.

Аммония дигидрофосфат. [7722-76-1]. $NH_4H_2PO_4$. (М.м. 115,03).

Дигидрофосфат аммония.

Кристаллический порошок белого цвета или бесцветные кристаллы.

Легко растворим в воде.

pH. Около 4,2 (2,3 % раствор).

(1*R*)-(-)-Аммония 10-камфоросульфонат. [82509-30-6]. $C_{10}H_{19}NO_4S$.

(М.м. 249,33).

[(1*R*,4*S*)-7,7-Диметил-2-оксобицикло[2.2.1]гепт-1-ил]метансульфонат аммония.

Содержит не менее 97,0 % $C_{10}H_{19}NO_4S$.

Бесцветные кристаллы или белый кристаллический порошок.

Легко растворим в воде, умеренно растворим в спирте 96 %.

$[\alpha]_d^{20}$. – 18±2 (5 % раствор).

Аммония карбамат. [1111-78-0]. $CH_6N_2O_2$. (М.м. 78,07).

Карбамат аммония.

Бесцветное кристаллическое вещество с запахом аммиака, гигроскопичен.

Очень хорошо растворяется в воде с образованием карбоната аммония.

На воздухе при атмосферном давлении диссоциирует с образованием аммиака и углекислого газа. При нагревании теряет воду с образованием мочевины.

Хранить при температуре 2–8 °С.

Аммония карбонат. [506-87-6]. $(NH_4)_2CO_3$. (М.м. 96,09).

Карбонат аммония (1:2).

Бесцветные мелкие кристаллы в массе белого цвета.

Очень легко растворим в воде, реагирует в горячей воде, практически нерастворим в спирте 96 %.

Аммония карбоната раствор 15,8 %. Раствор 158 г/л.

Аммония карбоната раствор 10 %.

10 г аммония карбоната растворяют в 30 мл воды, прибавляют 10 мл 10 % раствора аммиака и доводят объём раствора водой до 100,0 мл.

Аммония молибдат. [12054-85-2]. $(NH_4)_6Mo_7O_{24}\cdot 4H_2O$. (М.м. 1235,9).

Гептамолибдат гексааммония, тетрагидрат.

Бесцветные кристаллы или кристаллы от слегка желтоватого до зеленоватого цвета.

Растворим в воде, практически нерастворим в спирте 96 %.

Аммония молибдата раствор 10 %. Раствор 100 г/л.

Аммония молибдата раствор 2 %. Раствор 20 г/л.

Аммония молибдата раствор (pH 7,0). 5,0 г аммония молибдата растворяют при нагревании в 30 мл воды, затем охлаждают и доводят pH до 7,0 3,4 % раствором аммиака разведённым, объём полученного раствора доводят водой до 50,0 мл.

Аммония молибдата спиртовой сернокислый раствор.

Раствор I. 5,0 г аммония молибдата растворяют при нагревании в 20 мл воды.

Раствор II. Смешивают 150 мл спирта 96 % с 150 мл воды. При охлаждении прибавляют 100 мл серной кислоты концентрированной.

Непосредственно перед использованием к раствору I прибавляют раствор II в соотношении 20:80.

Аммония молибдата раствор в ацетоне.

1,0 г аммония молибдата растворяют в воде, доводят объём раствора тем же растворителем до 40 мл, прибавляют 3 мл 25 % хлористоводородной кислоты и доводят объём раствора ацетоном до 100,0 мл.

Хранят в защищенном от света месте.

Срок годности 1 мес.

Аммония молибдата раствор в 15 % серной кислоте.

1,0 г аммония молибдата растворяют в 40,0 мл 15 % (о/о) раствора серной кислоты концентрированной.

Срок годности 1 сут.

Аммония молибдата реактив.

Последовательно смешивают по 1 объёму 2,5 % раствора аммония молибдата, 10 % раствора аскорбиновой кислоты и 29,45 % раствора серной кислоты, затем прибавляют 2 объёма воды.

Хранят во флаконах оранжевого стекла. Срок годности 1 сут.

Аммония молибдата раствор в серной кислоте концентрированной (реактив Фреде).

0,1 г аммония молибдата растворяют в 10 мл серной кислоты концентрированной.

Хранят в банках оранжевого стекла. Срок годности 6 мес.

Аммония молибдата раствор в азотной кислоте.

Растворяют 6,5 г мелкораздробленной молибденовой кислоты в смеси 14 мл воды и 14,5 мл аммиака раствора концентрированного. Раствор охлаждают и постепенно при перемешивании прибавляют к смеси 32 мл охлажденного раствора азотной кислоты концентрированной и 40 мл воды и выдерживают в течение 48 ч, затем раствор фильтруют через плотный фильтр. Если при хранении раствора выделится осадок, его отделяют декантацией.

Аммония нитрат. [6484-52-2]. NH_4NO_3. (М.м. 80,04). Нитрат аммония. Кристаллический порошок белого цвета или бесцветные кристаллы; гигроскопичен.

Очень легко растворим в воде, легко растворим в метаноле, растворим в спирте 96 %.

Хранят в воздухонепроницаемой упаковке.

Аммония оксалат. [6009-70-7]. $C_2H_8N_2O_4 \cdot H_2O$. (М.м. 142,11). Оксалат диаммония, моногидрат.

Бесцветные кристаллы. Растворим в воде.

Аммония оксалата раствор 4 %. Раствор 40 г/л.

Аммония персульфат. [7727-54-0]. $(NH_4)_2S_2O_8$ (М.м. 228,20).

Пероксодисульфат диаммония.

Белый кристаллический порошок. Легко растворим в воде.

Аммония персульфата раствор 20 %.

20 г аммония персульфата растворяют в воде и доводят объём раствора водой до 100,0 мл. Используют свежеприготовленным.

Аммония персульфата раствор 10 %.

10 г аммония персульфата растворяют в воде и доводят объём раствора водой до 100,0 мл. Используют свежеприготовленным.

Аммония пирролидиндитиокарбамат. [5108-96-3]. $C_5H_{12}N_2S_2$.

(М.м. 164,29). Пирролидин-1-карбодитиоат аммония.

Кристаллический порошок от белого до светло-желтого цвета.

Умеренно растворим в воде, очень мало растворим в спирте 96 %.

Хранят в упаковке, содержащей небольшое количество аммония карбоната в полотняном мешочке.

Аммония рейнекат. [13573-16-5]. $NH_4[Cr(NCS)_4(NH_3)_2]\cdot H_2O$. (М.м. 354,44).

Диамминтетра(тиоцианато)хромат(III) аммония, моногидрат.

Порошок или кристаллы красного цвета.

Умеренно растворим в холодной воде, растворим в горячей воде и спирте 96 %.

В водном растворе разлагается с выделением свободного цианистого водорода (осторожно!).

Аммония рейнеката раствор 10 %. 10 г рейнеката аммония растворяют в воде и доводят объём раствора водой до 100 мл.

Используют свежеприготовленным.

Аммония рейнеката раствор 8 %. 8 г рейнеката аммония растворяют в воде и доводят объём раствора водой до 100 мл.

Используют свежеприготовленным.

Аммония рейнеката раствор 2,5 %. 2,5 г рейнеката аммония растворяют в воде и доводят объём раствора водой до 100 мл.

Используют свежеприготовленным.

Аммония рейнеката раствор 1 %. 1 г рейнеката аммония растворяют в воде и доводят объём раствора водой до 100 мл.

Используют свежеприготовленным.

Аммония роданид. **Аммоний роданистый**. См. **Аммония тиоцианат**.

Аммония сульфамат. [7773-06-0]. $NH_2SO_3NH_4$. (М.м. 114,12). Сульфамат аммония.

Кристаллический порошок белого цвета или бесцветные кристаллы; гигроскопичен.

Очень легко растворим в воде, мало растворим в спирте 96 %.

Температура плавления. Около 130 °С.

Хранят в воздухонепроницаемой упаковке.

Раствор аммония сульфамата 5 %.

5 г аммония сульфамата растворяют в воде и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл.

Аммония сульфат. [77383-20-2]. **(**$NH_4)_2SO_4$. (М.м. 132,14). Сульфат диаммония.

Бесцветные кристаллы или гранулы белого цвета.

Очень легко растворим в воде, практически нерастворим в ацетоне и спирте 96 %.

pH. От 4,5 до 6,0 (5 % раствор).

Сульфатная зола. Не более 0,1 %.

Аммония сульфата раствор 20 %.

20 г аммония сульфата растворяют в воде и доводят объём раствора водой до 100,0 мл.

Аммония тиоцианат. [1762-95-4]. NH_4SCN. (М.м. 76,12).

Тиоцианат аммония.

Бесцветные кристаллы, расплывающиеся на воздухе.

Очень легко растворим в воде, растворим в спирте 96 %.

Хранят в воздухонепроницаемой упаковке.

Аммония тиоцианата раствор 7,6 %.

7,6 г аммония тиоцианата растворяют в воде и доводят объём раствора водой до 100,0 мл.

Аммония тиоцианата раствор 5 %.

5 г аммония тиоцианата растворяют в воде и доводят объём раствора водой до 100,0 мл.

Аммония формиат. [540-69-2]. CH_5NO_2. (М.м. 63,06). Формиат аммония.

Расплывающиеся кристаллы или гранулы.

Очень легко растворим в воде, растворим в спирте 96 %.

Температура плавления. От 119 до 121 °С.

Хранят в воздухонепроницаемой упаковке.

Аммония фосфат. [7783-28-0]. $(NH_4)_2HPO_4$. (М.м. 132,06).

Гидрофосфат диаммония.

Кристаллы или гранулы белого цвета; гигроскопичен.

Очень легко растворим в воде, практически нерастворим в спирте 96 %.

pH. Около 8,0 (20 % раствор).

Хранят в воздухонепроницаемой упаковке.

Аммония хлорид. [12125-02-9]. NH_4Cl. (М.м. 53,49).

Хлорид аммония.

Белый кристаллический порошок.

Легко растворим в воде, растворим в спирте 96 %.

Аммония хлорида раствор 10,7 %. Раствор 107 г/л.

10,7 г аммония хлорида растворяют в воде и доводят объём раствора водой до 100,0 мл.

Аммония хлорида раствор 10 %.

10 г аммония хлорида растворяют в воде и доводят объём раствора водой до 100,0 мл.

Аммония хлорида раствор 2 % в спирте 70 %.

2,0 г аммония хлорида помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 50 мл спирта 70 % и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

Аммония церия(IV) нитрат. [16744-21-3]. $(NH_4)_2Ce(NO_3)_6$. (М.м. 548,2).

Гексанитрат диаммония-церия.

Кристаллический порошок оранжево-желтого цвета или прозрачные кристаллы оранжевого цвета.

Растворим в воде.

Аммония церия(IV) сульфат. [10378-47-9]. $(NH_4)_4Ce(SO_4)_4 \cdot 2H_2O$.

(М.м. 632,6). Тетрасульфат тетрааммония-церия, дигидрат.

Кристаллический порошок или кристаллы оранжево-желтого цвета.

Медленно растворим в воде.

Аммония цитрат. [3012-65-5]. $C_6H_{14}N_2O_7$. (М.м. 226,18).

2-Гидроксипропан-1,2,3-трикарбоксилат диамония.

Кристаллический порошок белого цвета или бесцветные кристаллы.

Легко растворим в воде, мало растворим в спирте 96 %.

pH. Около 4,3 (2,26 % раствор).

Ангидрид уксусный. См. **Уксусный ангидрид**.

Ангидрида уксусного раствор 12 % (о/о) в безводном пиридине.

12 мл уксусного ангидрида смешивают с 88 мл безводного пиридина.

Хранят в банках оранжевого стекла с притертыми пробками.

Ангидрид фталевый. См. **Фталевый ангидрид**.

Ангидрон. См. **Магния перхлорат**.

Анетол. [4180-23-8]. $C_{10}H_{12}O$. (М.м. 148,20).

1-Метокси-4-[(1*E*)-проп-1-ен-1-ил]бензол.

Кристаллическая масса белого цвета при температуре до 20 – 21 °С, при температуре выше 23 °С – жидкость.

Практически нерастворим в воде, легко растворим в этаноле, эфире, этилацетате и петролейном эфире.

d_{20}^{20}. Около 1,56.

Температура кипения. Около 230 °С.

Хроматографическая чистота анетола, используемого в газовой хроматографии, должна быть не менее 99,0 %.

***цис*-Анетол**. [25679-28-1]. $C_{10}H_{12}O$. (М.м. 148,20).

1-Метокси-4-[(1*Z*)-проп-1-ен-1-ил]бензол.

Кристаллическая масса белого цвета при температуре до 20 – 21 °С, при температуре выше 23 °С – жидкость.

Практически нерастворим в воде, легко растворим в этаноле, растворим в эфире, этилацетате и петролейном эфире.

n_D^{25}. Около 1,56.

Температура кипения. Около 230 °С.

Хроматографическая чистота *цис*-анетола, используемого в газовой хроматографии, должна быть не менее 92,0 %.

***п*-Анизидин**. [104-94-9]. C_7H_9NO. (М.м. 123,15). 4-Метоксианилин.

Содержит не менее 97,0 % C_7H_9NO.

Кристаллы белого цвета.

Умеренно растворим в воде, растворим в этаноле.

Вызывает раздражение кожи; сенсибилизатор.

Хранят в защищенном от света месте при температуре от 0 до 4 °С.

При хранении *п*-анизидин темнеет вследствие окисления. Окисленный *п*-анизидин может быть восстановлен и обесцвечен следующим образом:

20 г *п*-анизидина растворяют в 500 мл воды при температуре 75 °С, прибавляют 1 г натрия сульфита и 10 г угля активированного, перемешивают в течение 5 мин и фильтруют. Полученный фильтрат охлаждают и выдерживают при температуре около 0 °С в течение не менее 4 ч, затем фильтруют, полученные кристаллы промывают небольшим количеством воды, охлажденной до температуры 0 °С, и сушат в вакууме над фосфора(V) оксидом.

Анилин. [62-53-3]. C_6H_7N. (М.м. 93,13). Анилин.

Бесцветная или желтоватого цвета жидкость.

Растворим в воде, смешивается со спиртом 96 % и эфиром.

d_{20}^{20}. Около 1,02.

Температура кипения. От 183 до 186 °С.

Хранят в защищенном от света месте.

Анилина гидрохлорид. [142-04-1]. $C_6H_7N \cdot HCl$. (М.м. 129,59).

Анилина гидрохлорид.

Содержит не менее 99,0 $C_6H_7N \cdot HCl$.

Бесцветные кристаллы.

Температура кипения. От 196 до 198 °С.

Анилина сульфат. [542-16-5]. $(C_6H_7N)_2 \cdot H_2SO_4$. (М.м. 284,33).

Анилина сульфат (2:1).

Содержит не менее 98,0 % $(C_6H_7N)_2 \cdot H_2SO_4$.

Бесцветные кристаллы.

Растворим в воде, мало растворим в этаноле, нерастворим в эфире.

Анионообменная смола.

Смола в хлоридной форме, содержащая четвертичные аммониевые группы [$CH_2N^+(CH_3)_3$], присоединенные к полимерной решетке, состоящей из полистирола поперечно-сшитого 2 % дивинилбензола. Выпускают в виде гранул, размер которых должен быть указан в фармакопейных статьях.

Смолу промывают на стеклянном фильтре (40) 1 М раствором натрия гидроксида до отрицательной реакции на хлориды в промывном растворе, затем промывают водой до получения нейтральной реакции в промывной воде. Суспендируют в свежеприготовленной воде, свободной от аммиака, и защищают от углерода диоксида.

Анионообменная смола сильноосновная.

Гелеобразная смола в ОН-форме, содержащая четвертичные аммониевые группы [$CH_2N^+(CH_3)_3$, тип I], присоединенные к полимерной решетке, состоящей из полистирола поперечно-сшитого 8 % дивинилбензола.

Прозрачные гранулы коричневого цвета.

Размер частиц: от 0,2 мм до 1,0 мм.

Содержание влаги. Около 50 %.

Статическая обменная емкость (СОЕ). Не менее 1,2 мэкв/мл.

Анионообменная смола сильноосновная для хроматографии.

Смола с четвертичными аммониевыми группами, присоединенными к решетке латекса поперечно-сшитого дивинилбензолом.

Анисовый альдегид. [123-11-5]. $C_8H_8O_2$. (М.м. 136,15).

4-Метоксибензальдегид.

Маслянистая жидкость.

Очень мало растворим в воде, смешивается со спиртом 96 % и эфиром.

Температура кипения. Около 248 °С.

Хроматографическая чистота анисового альдегида, используемого в газовой хроматографии, должна быть не менее 99,0 %.

Анисового альдегида раствор уксуснокислый в метаноле.

Последовательно смешивают 0,5 мл анисового альдегида, 10 мл уксусной кислоты ледяной, 85 мл метанола и 5 мл серной кислоты концентрированной.

Анисового альдегида раствор уксуснокислый в этаноле.

Последовательно смешивают 0,5 мл анисового альдегида, 10 мл уксусной кислоты ледяной, 85 мл этанола и 5 мл серной кислоты концентрированной.

Анисового альдегида раствор спиртовой сернокислый.

10 мл анисового альдегида смешивают с 90 мл спирта 96 %, прибавляют 10 мл серной кислоты концентрированной и перемешивают.

Анисового альдегида раствор спиртовой сернокислый (2).

0,5 мл анисового альдегида смешивают с 10 мл уксусной кислоты ледяной, 85 мл спирта 96 %, прибавляют 5 мл серной кислоты концентрированной и перемешивают.

Анолит для изоэлектрофокусировки pH от 3 до 5 (0,1 М раствор кислоты глутаминовой и 0,5 М раствор кислоты фосфорной).

К раствору 14,71 г глутаминовой кислоты в воде прибавляют 33 мл фосфорной кислоты концентрированной и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл.

Антимонила калия тартрат. [28300-74-5]. $C_4H_4KO_7Sb \cdot 0{,}5H_2O$.

(М.м. 333,93).

Аква[тартрато(4-)-O^1,O^2,O^3]антимонат(III) калия, гемигидрат.

Гранулированный порошок белого цвета или прозрачные бесцветные кристаллы.

Растворим в воде и глицерине, легко растворим в кипящей воде, практически нерастворим в спирте 96 %.

Водный раствор имеет слабокислую реакцию.

Антраниловая кислота. См. **2-Аминобензойная кислота**.

Антрацен. [120-12-7]. $C_{14}H_{10}$. (М.м. 178,22). Антрацен.

Кристаллический порошок белого цвета.

Практически нерастворим в воде, мало растворим в хлороформе.

Температура плавления. Около 218 °С.

Антрон. [90-44-8]. $C_{14}H_{10}O$. (М.м. 194,23). Антрацен-9(10*H*)-он.

Кристаллический порошок светло-желтого цвета.

Практически нерастворим в воде, растворим в спирте 96 %, растворим в бензоле.

Температура плавления. Около 155 °С.

Арабиноза. [87-72-9]. $C_5H_{10}O_5$. (М.м. 150,13). L-Арабинопираноза.

Кристаллический порошок белого цвета.

Легко растворима в воде.

$[\alpha]_D^{20}$. От + 103° до + 105° (5 % раствор в воде, содержащей около 0,05 % NH_3).

Арбутин. [497-76-7]. $C_{12}H_{16}O_7$. (М.м. 272,25).

4-Гидроксифенил-β-D-глюкопиранозид.

Мелкие, блестящие игольчатые кристаллы белого цвета.

Легко растворим в воде, очень легко растворим в горячей воде, растворим в спирте 96 %, практически нерастворим в эфире.

$[\alpha]_D^{20}$. Около – 64° (2 % раствор).

Температура плавления. Около 200 °С.

Аргон. [7440-37-1]. Ar. (А.м. 39,95). Аргон.

Содержит не менее 99,995 % (о/о) Ar.

Арсеназо I. [520-10-5]. $C_{16}H_{10}AsN_2Na_3O_{11}S_2$ (М.м. 614,3).

3-[(2-Арсонофенил)диазенил]-4,5-дигидроксинафталин-2,7-дисульфонат тринатрия.

Порошок красно-коричневого цвета. Легко растворим в воде.

Арсеназо III. [1668-00-4]. $C_{22}H_{18}As_2N_4O_{14}S_2$. (М.м. 776,4).

3,6-Бис[(2-арсонофенил)диазенил]-4,5-дигидроксинафталин-2,7-дисульфоновая кислота.

Порошок тёмно-красного цвета. Легко растворим в воде.

Аскорбиновая кислота. [50-81-7]. $C_6H_8O_6$. (М.м. 176,12).

(5*R*)-5-[(1*S*)-1,2-Дигидроксиэтил]-3,4-дигидроксифуран-2(5*H*)-он.

Белый или почти белый кристаллический порошок или бесцветные кристаллы, изменяют окрашивание под воздействием света и влаги.

Легко растворима в воде, растворима в спирте 96 %, практически нерастворима в эфире.

Аскорбиновой кислоты раствор 0,1 %.

50 мг аскорбиновой кислоты растворяют в 0,5 мл воды и доводят объём раствора диметилформамидом до 50,0 мл.

L-Аспартил-L-фенилаланин. [13433-09-5]. $C_{13}H_{16}N_2O_5$. (М.м. 280,28).

L-Аспартил-L-фенилаланин.

Порошок белого цвета.

Температура плавления. Около 210 °С с разложением.

Ацеталь. [105-57-7]. $C_6H_{14}O_2$. (М.м. 118,17). 1,1-Диэтоксиэтан.

Прозрачная, бесцветная, летучая жидкость.

Смешивается с водой и спиртом 96 %.

d_{20}^{20}. Около 0,824.

n_D^{20}. Около 1,382.

Температура кипения. Около 103 °С.

Ацетальдегид. [75-07-0]. C_2H_4O. (М.м. 44,05).

Ацетальдегид.

Прозрачная бесцветная, воспламеняющаяся жидкость. Смешивается с водой и спиртом 96 %.

d_{20}^{20}. Около 0,788.

n_D^{20}. Около 1,332.

Температура кипения. Около 21 °С.

Ацетаминофен. См. **Парацетамол**.

Ацетилацетамид. [5977-14-0]. $C_4H_7NO_2$. (М.м. 101,10).

3-Оксобутанамид.

Легко растворим в этаноле и ацетоне.

Температура плавления. От 53 до 56 °С.

Ацетилацетон. [123-54-6]. $C_5H_8O_2$. (М.м. 100,12). Пентан-2,4-дион.

Бесцветная или слегка желтоватого цвета, легко воспламеняющаяся жидкость.

Легко растворим в воде, смешивается с ацетоном, спиртом 96 %, эфиром и уксусной кислотой ледяной.

n_D^{20}. От 1,452 до 1,453.

Температура кипения. От 138 до 140 °С.

Ацетилацетона реактив.

К 100 мл 15 % раствора аммония ацетата прибавляют 0,2 мл ацетилацетона.

Ацетилирующая смесь.

Смешивают 1 часть уксусного ангидрида и 3 части перегнанного пиридина (фракция с температурой кипения от 114 до 115 °С). Смесь должна быть бесцветной. Смесь применяют свежеприготовленной. Обращаться с осторожностью.

***N*-Ацетил-ε-капролактам**. [1888-91-1]. $C_8H_{13}NO_2$. (М.м 155,19).

1-Ацетилазепан-2-он.

Бесцветная жидкость. Смешивается с этанолом.

d_{20}^{20}. Около 1,100.

n_D^{20}. Около 1,489.

Температура кипения. Около 135 °С.

***N*-Ацетилнейраминовая кислота**. [131-48-6]. $C_{11}H_{19}NO_9$. (М.м. 309,27).

5-Ацетамидо-3,5-дидезокси-D-*глицеро*-α-D-*галакто*-нон-2-улопиранозовая кислота.

Игольчатые кристаллы белого цвета.

Растворима в воде и метаноле, мало растворима в спирте 96 %, практически нерастворима в ацетоне и эфире.

$[\alpha]_D^{20}$. Около – 36° (1 % раствор).

Температура плавления. Около 186 °С с разложением.

Ацетилтирозина этиловый эфир. [36546-50-6]. $C_{13}H_{17}NO_4 \cdot H_2O$.

(М.м. 269,29).

Этил[(2*S*)-2-ацетамидо-3-(4-гидроксифенил)пропаноат] моногидрат.

Кристаллический порошок белого цвета; пригоден для количественного определения химотрипсина.

$[\alpha]_D^{20}$. От + 21° до + 25° (1 % раствор в спирте 96 %).

$A_{1см}^{1\%}$. От 60 до 68. Определение проводят при длине волны 278 нм в спирте 96 %.

Ацетилтирозина этилового эфира 0,2 М раствор.

0,54 г ацетилтирозина этилового эфира растворяют в спирте 96 % и доводят объём раствора тем же растворителем до 10,0 мл.

***N*-Ацетилтриптофан**. [1218-34-4]. $C_{13}H_{14}N_2O_3 \cdot H_2O$. (М.м. 246,26).

N-Ацетилтриптофан.

Порошок белого или почти белого цвета или бесцветные кристаллы.

Мало растворим в воде, растворим в разведённых растворах гидроксидов щелочных металлов.

Температура плавления. Около 205 °С.

Ацетилхлорид. [75-36-5]. C_2H_3ClO. (М.м. 78,50).

Ацетилхлорид.

Прозрачная, бесцветная, воспламеняющаяся жидкость.

Разлагается в воде и спирте 96 %, смешивается с эфиром и бензолом, растворим в ацетоне, хлороформе и толуоле.

Обращаться с осторожностью.

d_{20}^{20}. Около 1,10.

Температурные пределы перегонки. От 49 до 53 °С; должно перегоняться не менее 95 %.

Ацетилхолина хлорид. [60-31-1]. $C_7H_{16}ClNO_2$. (М.м. 181,66).

2-(Ацетилокси)-*N*,*N*,*N*-триметилэтан-1-аминия хлорид.

Кристаллический порошок.

Очень легко растворим в холодной воде и спирте 96 %, практически нерастворим в эфире; разлагается в горячей воде и разведённых растворах гидроксидов щелочных металлов.

Хранят при температуре -20 °С.

Ацетилэвгенол. [93-28-7]. $C_{12}H_{14}O_3$. (М.м. 206,24).

[2-Метокси-4-(проп-2-ен-1-ил)фенил]ацетат.

Маслянистая жидкость желтого цвета.

Легко растворим в спирте 96 % и эфире, практически нерастворим в воде.

n_D^{20}. Около 1,521.

Температура кипения. От 281 до 282 °С.

Хроматографическая чистота ацетилэвгенола, используемого в газовой хроматографии, должна быть не менее 98,0 %.

Ацетон. [67-64-1]. C_3H_6O. (М.м. 58,08). Пропан-2-он.

Бесцветная, прозрачная, легко воспламеняющаяся жидкость с характерным запахом.

Температура кипения. 56,24 °С.

Растворим в хлороформе, смешивается с водой, спиртом 96 % и эфиром.

При необходимости используют ацетон особой чистоты.

Обращаться с осторожностью.

Ацетон безводный.

Ацетон сушат безводным натрия сульфатом в течение 12 ч.

Ацетонитрил. [75-05-8]. C_2H_3N. (М.м. 41,05).

Прозрачная, бесцветная жидкость.

Смешивается с водой, ацетоном, эфиром и метанолом.

d_{20}^{20}. Около 0,78.

n_D^{20}. Около 1,344.

Раствор 100 г/л ацетонитрила имеет нейтральную реакцию по лакмусовой бумаге.

Температурные пределы перегонки. От 80 до 82 °С; должно перегоняться не менее 95 %.

Ацетонитрил, используемый для спектрофотометрии, должен выдерживать следующее дополнительное испытание.

Минимальное пропускание. 98 %. Определение проводят в области длин волн от 255 до 420 нм, используя в качестве раствора сравнения воду.

Ацетонитрил для хроматографии.

Ацетонитрил, используемый в хроматографии, должен выдерживать следующее дополнительное испытание.

Минимальное пропускание: 98 %. Определение проводят при длине волны 240 нм, используя в качестве раствора сравнения воду.

Минимальная чистота: 99,8 %.

БАПНА. [911-77-3]. $C_{19}H_{22}N_6O_4 \cdot HCl$. (М.м. 434,9).

N^{α}-Бензоил-*N*-(4-нитрофенил)-DL-аргининамида гидрохлорид.

Порошок от белого до светло-коричневого цвета.

Температура плавления. 257–276 °С.

Хранить при температуре –20 °С.

Барбитуровая кислота. [67-52-7]. $C_4H_4N_2O_3$. (М.м. 128,09).

Пиримидин-2,4,6(1*H*,3*H*,5*H*)-трион.

Бария гидроксид. [12230-71-6]. $Ba(OH)_2 \cdot 8H_2O$. (М.м. 315,47).

Гидроксид бария, октагидрат.

Белые или бесцветные кристаллы.

Растворим в воде. Ядовит.

Бария гидроксида раствор 10 %.

К 10,0 г бария гидроксида прибавляют 80 мл предварительно нагретой до 50 °С воды и перемешивают в течение 30 мин. Доводят объём раствора водой до 100 мл. Полученный раствор выдерживают при комнатной температуре в течение 24 ч и фильтруют. Перед использованием раствор повторно фильтруют.

Бария гидроксида раствор 4,73 %. Раствор 47,3 г/л.

Бария гидроксида раствор 5 %. Баритовая вода.

5 г бария гидроксида взбалтывают со 100 мл свежепрокипяченной и охлажденной воды. Используют свежеприготовленным. Ядовит.

Бария карбонат. [513-77-9]. $BaCO_3$. (М.м. 197,34).

Карбонат бария.

Порошок белого цвета или рассыпчатая масса.

Практически нерастворим в воде, спирте 96 %, растворим в растворе аммония хлорида.

Бария нитрат. [10022-31-8]. $Ba(NO_3)_2$ (М.м. 261,34).

Нитрат бария.

Бесцветные кристаллы. Растворим в холодной воде; легко растворим в горячей воде. Ядовит.

Бария нитрата раствор 5 %. 5 г бария нитрата растворяют в воде и доводят объём раствора водой до 100 мл. Раствор фильтруют. Ядовит.

Бария сульфат. [7727-43-7]. $BaSO_4$. (М.м. 233,39).

Сульфат бария.

Белый порошок.

Практически нерастворим в воде.

Бария хлорид. [10326-27-9]. $BaCl_2 \cdot 2H_2O$. (М.м. 244,27).

Хлорид бария.

Бесцветные прозрачные кристаллы.

Легко растворим в воде, мало растворим в спирте 96 %. Ядовит.

Бария хлорида раствор 20 %. Раствор 200 г/л. Ядовит.

Бария хлорида раствор 6,1 %. Раствор 61 г/л. Ядовит.

Бария хлорида раствор 5 %. Раствор 50 г/л. Ядовит.

Бария хлорида раствор 3,65 %. Раствор 36,5 г/л. Ядовит.

Бензальдегид. [100-52-7]. C_7H_6O. (М.м. 106,12).

Бесцветная или слегка желтоватого цвета жидкость, сильно преломляющая свет, с запахом горького миндаля.

Мало растворим в воде, смешивается со спиртом 96 % и эфиром.

d_{20}^{20}. Около 1,05.

n_D^{20}. Около 1,545.

Температурные пределы перегонки. От 177 до 180 °С; должно перегоняться не менее 95 %.

На воздухе легко окисляется с образованием бензойной кислоты.

Хранят в защищенном от света месте.

Бензальдегида раствор насыщенный.

1 мл бензальдегида взбалтывают в склянке с 250 мл воды. Смесь оставляют до следующего дня, время от времени взбалтывая. Перед применением сливают прозрачную жидкость. Используют свежеприготовленным.

Бензидин. [92-87-5]. $C_{12}H_{12}N_2$ (М.м. 184,24). Бифенил-4,4'-диамин.

Белые или слегка желтоватые мелкоигольчатые кристаллы.

Практически нерастворим в воде, растворим в спирте 96 % и эфире.

Обращаться с осторожностью.

Бензил. [134-81-6]. $C_{14}H_{10}O_2$ (М.м. 210,23).

1,2-Дифенилэтан-1,2-дион.

Кристаллический порошок желтоватого цвета.

Нерастворим в воде, растворим в спирте 96 %, этилацетате и толуоле.

Температура плавления. 95 °С.

Бензилбензоат. [120-51-4]. $C_{14}H_{12}O_2$ (М.м. 212,24). Бензилбензоат.

Бесцветные или почти бесцветные кристаллы, или бесцветная или почти бесцветная маслянистая жидкость.

Практически нерастворим в воде, смешивается со спиртом 96 %, эфиром, метиленхлоридом, с жирными и эфирными маслами.

Бензилкоричный эфир. [103-41-3]. $C_{16}H_{14}O_2$ (М.м. 238,28).

Бензил(3-фенилпроп-2-еноат).

Бесцветные или желтоватого цвета кристаллы.

Практически нерастворим в воде, растворим в спирте 96 % и эфире.

Температура плавления. Около 39 °С.

Бензиловая кислота. [76-93-7]. $C_{14}H_{12}O_3$. (М.м. 228,24).

Гидрокси(дифенил)уксусная кислота.

Содержит не менее 99,0 % $C_{14}H_{12}O_3$.

Температура плавления. От 149 до 151 °С.

Бензиловый спирт. [100-51-6]. C_7H_8O. (М.м. 108,14).

Фенилметанол.

Прозрачная, бесцветная, холодящая, маслянистая жидкость.

Растворим в воде; смешивается со спиртом 96 %, эфиром, жирными и эфирными маслами.

2-Бензилпиридин. [101-82-6]. $C_{12}H_{11}N$. (М.м. 169,22).

2-Бензилпиридин.

Содержит не менее 98,0 % $C_{12}H_{11}N$.

Жидкость желтого цвета.

Температура плавления. От 13 до 16 °С.

Бензин авиационный. См. ГОСТ 1012-72.

Бензоиларгинина этилового эфира гидрохлорид. [2645-08-1].

$C_{15}H_{23}ClN_4O_3$. (М.м. 342,82).

Этил[(2*S*)-5-карбамимидамидо-2-бензамидопентаноата гидрохлорид.

Кристаллический порошок белого цвета.

Очень легко растворим в воде и этаноле, практически нерастворим в эфире.

$[\alpha]_D^{20}$ от – 15° до – 18° (1 % раствор).

Температура плавления. Около 129 °С.

$A_{1см}^{1\%}$: от 310 до 340. Определение проводят при длине волны 227 нм, используя 0,001 % раствор.

Бензоилхлорид. [98-88-4]. C_7H_5ClO. (М.м. 140,57). Бензоилхлорид.

Бесцветная, слезоточивая жидкость.

Растворим в эфире, разлагается в воде и спирте 96 %.

Обращаться с осторожностью.

d_{20}^{20}. Около 1,21.

Температура кипения. Около 197 °С.

Бензоин. [579-44-2]. $C_{14}H_{12}O_2$. (М.м. 212,24).

(2*RS*)-2-Гидрокси-1,2-дифенилэтан-1-он.

Кристаллы слегка желтоватого цвета.

Очень мало растворим в воде, легко растворим в ацетоне, растворим в горячем спирте 96 %, умеренно растворим в эфире.

Температура плавления. Около 137 °С.

Бензойная кислота. [65-85-0]. $C_7H_6O_2$. (М.м. 122,12).

Бензойная кислота.

Бесцветные игольчатые кристаллы или белый мелкокристаллический порошок.

Мало растворима в воде, легко растворима в спирте 96 %, растворима в хлороформе и бензоле.

Температура плавления. От 121 до 124 °С.

Бензокаин. [94-09-7]. $C_9H_{11}NO_2$. (М.м. 165,19).

Этил(4-аминобензоат)**.**

Белый или почти белый кристаллический порошок или бесцветные кристаллы.

Легко растворим в спирте 96 % и хлороформе, очень мало растворим в воде.

Бензол. [71-43-2]. C_6H_6. (М.м. 78,11).

Бензол.

Прозрачная, бесцветная, воспламеняющаяся жидкость.

Практически нерастворим в воде, смешивается со спиртом 96 % и эфиром.

Температура кипения. Около 80 °С.

Ядовит.

Бензофенон. [119-61-9]. $C_{13}H_{10}O$. (М.м. 182,22).

Дифенилметанон..

Кристаллы в виде призм.

Практически нерастворим в воде, легко растворим в спирте 96 % и эфире, растворим в хлороформе.

Температура плавления. Около 48 °С.

1,4-Бензохинон. [106-51-4]. $C_6H_4O_2$. (М.м. 108,09).

Циклогекса-2,5-диен-1,4-дион.

Желтоватые призмы или кристаллический порошок.

Очень мало растворим в воде, растворим в спирте 96 % и эфире.

Бензэтония хлорид. [121-54-0]. $C_{27}H_{42}ClNO_2 \cdot H_2O$. (М.м. 466,1).

N-Бензил-*N*,*N*-диметил-2-{2-[4-(1,1,3,3-тетраметилбутил)фенокси]этокси}этан-1-аминий хлорид, моногидрат.

Мелкокристаллический порошок белого цвета или бесцветные кристаллы.

Растворим в воде и спирте 96 %, мало растворим в эфире.

Температура плавления. Около 163 °С.

Хранят в защищенном от света месте.

Бергаптен. [484-20-8]. $C_{12}H_8O_4$. (М.м. 216,19).

4-Метокси-7*H*-фуро[3,2-*g*][1]бензопиран-7-он.

Бесцветные кристаллы.

Практически нерастворим в воде, умеренно растворим в спирте 96 % и мало растворим в уксусной кислоте ледяной.

Температура плавления. Около 188 °С.

Бертолетова соль. См. **Калия хлорат**.

Бетадекс. [7585-39-9]. $C_{42}H_{70}O_{35}$. (М.м. 1135,0).

Циклогептакис-(1→4)-(α-D-глюкопиранозил).

Содержит не менее 97 % $C_{42}H_{70}O_{35}$.

Растворим в 1 М растворе аммиака, умеренно растворим в воде, практически нерастворим в этаноле.

$[\alpha]_D^{20}$. От +159° до +165° (1,5 % в воде).

Температура плавления. От 290° до 300° (с разл.).

Бисбензимид. [23491-44-3]. $C_{25}H_{24}N_6O \cdot 3HCl \cdot 5H_2O$. (М.м. 624,0).

4-[5-(4-Метилпиперазин-1-ил)[1*H*,1'*H*-2,5'-бибензимидазол]-2'-ил]фенол тригидрохлорид, пентагидрат.

Бисбензимида исходный раствор 0,005 %.

5 мг бисбензимида растворяют в воде и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл.

Хранят в темном месте.

Бисбензимида рабочий раствор.

Непосредственно перед использованием 100 мкл исходного раствора бисбензимида доводят фосфатным забуференным физиологическим раствором pH 7,4 до 100,0 мл.

Биурет. [108-19-0]. $C_2H_5N_3O_2$. (М.м. 103,08).

2-Имидодикарбодиамид.

Кристаллы белого цвета; гигроскопичны.

Растворим в воде, умеренно растворим в спирте 96 %, очень мало растворим в эфире.

Температура плавления. От 188 до 190 °С с разложением.

Хранят в воздухонепроницаемой упаковке.

Биуретовый реактив.

1,5 г меди(II) сульфата и 6,0 г калия-натрия тартрата растворяют в 500 мл воды, прибавляют 300 мл 10 % раствора натрия гидроксида, свободного от карбонатов, доводят объём раствора тем же растворителем до 1000,0 мл и перемешивают.

Бифенил. [92-52-4]. $C_{12}H_{10}$. (М.м. 154,21).

1,1'-Бифенил.

Кристаллический порошок белого цвета.

Практически нерастворим в воде.

Температура плавления. От 68 до 70 °С.

Бифенил-4-ол. [92-69-3]. $C_{12}H_{10}O$. (М.м. 170,21).

[1,1'-Бифенил]-4-ол.

Кристаллический порошок белого цвета.

Практически нерастворим в воде.

Температура плавления. От 164 до 167 °С с разложением.

Бора фторид. [7637-07-2]. BF_3. (М.м. 67,81). Трифторид бора.

Бесцветный газ.

Бора фторид в метаноле 14 %. Раствор 140 г/л в метаноле.

Бора хлорид. [10294-34-5]. BCl_3. (М.м. 117,18). Трихлорид бора.

Бесцветный газ. Бурно реагирует с водой. Используют в виде растворов в подходящих растворителях (2-хлорэтанол, метиленхлорид, гексан, гептан, метанол).

Ядовит, вызывает коррозию.

Температура кипения. Около 12,6 °С.

n_D^{20}. Около 1,420.

Бора хлорида раствор в метаноле 12 %. Раствор 120 г/л в метаноле.

Хранят в защищенном от света месте при температуре – 20 °С, преимущественно в ампулах.

Борная кислота. [10043-35-3]. H_3BO_3. (М.м. 61,83). Борная кислота.

Бесцветные, блестящие, слегка жирные на ощупь чешуйки или мелкий кристаллический порошок.

Легко растворима в горячей воде (100 °С), глицерине; растворима в спирте 96 %, очень мало растворима в ацетоне.

Борной кислоты раствор 4 %.

4 г борной кислоты растворяют в воде при нагревании, охлаждают и доводят объём раствора водой до 100,0 мл.

Борной кислоты раствор 2 %.

2 г борной кислоты растворяют в воде при нагревании, охлаждают и доводят объём раствора водой до 100,0 мл.

Борной кислоты раствор 0,2 % спиртовой.

0,5 г борной кислоты растворяют при нагревании в смеси 25 мл спирта 96 % и 20 мл воды в мерной колбе вместимостью 250 мл, охлаждают и доводят объём раствора спиртом 96 % до метки.

Борной кислоты 0,6 М раствор.

37,098 г борной кислоты растворяют при нагревании в 250 – 300 мл воды, доводят объём раствора водой до 1000,0 мл.

Борной кислоты 0,2 М раствор.

12,366 г борной кислоты растворяют при нагревании в 100 – 150 мл воды, доводят объём раствора водой до 1000,0 мл.

Борнеол. [507-70-0]. $C_{10}H_{18}O$. (М.м. 154,25).

(1*R*,2*S*,4*R*)-1,7,7-Триметилбицикло[2.2.1]гептан-2-ол.

Бесцветные кристаллы. Легко сублимируется.

Практически нерастворим в воде, легко растворим в спирте 96 %, эфире и петролейном эфире.

Температура плавления. Около 208 °С.

Хроматография. Определение проводят методом тонкослойной хроматографии (ТСХ), используя в качестве тонкого слоя силикагель G. На линию старта хроматографической пластинки наносят 10 мкл 0,1 % раствора в толуоле. Хроматографируют в хлороформе. Когда фронт растворителя пройдет 10 см от линии старта, пластинку вынимают из камеры, сушат на воздухе и опрыскивают раствором анисового альдегида, расходуя 10 мл на пластинку площадью 200 мм^2, сушат при температуре от 100 до 105 °С в течение 10 мин. На хроматограмме должно обнаруживаться только одно основное пятно.

Борнилацетат. [5655-61-8]. $C_{12}H_{20}O_2$. (М.м. 196,29).

{(1*R*,2*S*,4*R*)-1,7,7-Триметилбицикло[2.2.1]гепт-2-ил}ацетат.

Бесцветные кристаллы или бесцветная жидкость.

Очень мало растворим в воде, растворим в спирте 96 % и эфире.

Температура плавления. Около 28 °С.

Хроматография. Определение проводят методом тонкослойной хроматографии, используя в качестве тонкого слоя силикагель G. На линию старта хроматографической пластинки наносят 10 мкл 0,2 % раствора в толуоле. Хроматографируют в хлороформе. Когда фронт растворителя пройдет 10 см, пластику вынимают из камеры, сушат на воздухе и опрыскивают раствором анисового альдегида, расходуя 10 мл на пластинку площадью 200 мм^2, сушат при температуре от 100 до 105 °С в течение

10 мин. На хроматограмме должно обнаруживаться только одно основное пятно.

Бриллиантовый синий. См. **Кислотный синий**.

Бром. [7726-95-6]. Br_2. (М.м. 159,81).

Бром.

Красно-бурая легко летучая жидкость с удушливым запахом.

Мало растворим в воде, растворим в спирте 96 % и эфире.

Обращаться с осторожностью.

Брома раствор.

30 г брома и 30 г калия бромида растворяют в воде и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл.

Бромная вода.

3 мл брома встряхивают с 100 мл воды до насыщения.

Хранят над избытком брома в банке оранжевого стекла с притертой пробкой, в прохладном защищенном от света месте.

Брома раствор спиртовой.

В коническую колбу вместимостью 250 мл помещают 90 мл спирта 96 %, при перемешивании и охлаждении колбы снаружи льдом осторожно постепенно прибавляют 10 мл отмеренного мерным цилиндром брома.

Хранят в банке оранжевого стекла, закрытой притертой пробкой, в темном, прохладном месте.

5-Бром-2′-деоксиуридин. [59-14-3]. $C_9H_{11}BrN_2O_5$. (М.м. 307,10).

5-Бром-1-(2-дезокси-β-D-рибофуранозил)пиримидин-2,4(1*H*,3*H*)-дион.

Температура плавления. Около 194 °С.

Бромистоводородной кислоты 30 % раствор.

30 % раствор бромистого водорода в уксусной кислоте ледяной.

Перед вскрытием содержимое осторожно дегазируют.

Бромистоводородная кислота разведённая.

5,0 мл 30 % раствора бромистоводородной кислоты помещают во флаконы из темного стекла, укупоривают в атмосфере аргона полиэтиленовыми

пробками и хранят в защищенном от света месте. Непосредственно перед использованием прибавляют 5,0 мл уксусной кислоты ледяной и перемешивают.

Хранят в темном месте.

Бромистоводородной кислоты 47 % раствор.

Раствор 47 % (м/м) бромистого водорода в воде.

Бромистоводородная кислота разведённая 0,79 %. Содержит 7,9 г/л HBr.

16,81 г 47 % раствора бромистоводородной кислоты растворяют в воде и доводят объём раствора тем же растворителем до 1000,0 мл.

Бромкрезоловый зеленый (синий). [76-60-8]. $C_{21}H_{14}Br_4O_5S$. (М.м. 698,0).

3,3-Бис(3,5-дибром-4-гидрокси-2-метилфенил)-3*H*-2,1λ^6-бензоксатиол-1,1-дион.

Порошок белого с коричневатым оттенком цвета.

Мало растворим в воде, растворим в спирте 96 % и разведённых растворах гидроксидов щелочных металлов.

Бромкрезолового зеленого (синего) раствор 0,4 % в спирте 96 %.

0,4 г бромкрезолового зеленого (синего) помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 50 мл спирта 96 % и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

Хранят в прохладном, защищённом от света месте.

Срок годности 6 месяцев.

Бромкрезолового зеленого (синего) раствор 0,05 %.

50 мг бромкрезолового зеленого растворяют в 0,72 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида и 20 мл спирта 96 %, доводят объём раствора водой до 100,0 мл.

Испытание на чувствительность. К 100 мл воды, свободной от углерода диоксида, прибавляют 0,2 мл раствора бромкрезолового зеленого; появляется синее окрашивание, которое переходит в желтое при прибавлении не более 0,2 мл 0,02 М раствора хлористоводородной кислоты.

Переход окраски от желтой к синей в интервале pH 3,6 – 5,2.

Бромкрезолового зеленого (синего) раствор 0,04 %.

0,1 г индикатора растворяют в 7,15 мл 0,02 М раствора натрия гидроксида и доводят объём раствора свежепрокипяченной и охлажденной водой до 250,0 мл.

Переход окраски раствора от желтой к синей в интервале pH 3,8 – 5,4.

Бромкрезолового зеленого (синего) раствор 0,1 %.

0,1 г индикатора растворяют в 50 мл спирта 96 % и доводят объём раствора водой до 100,0 мл.

Переход окраски раствора от желтой к синей в интервале pH 3,8 – 5,4.

Бромкрезолового зеленого и метилового красного раствор.

0,15 г бромкрезолового зеленого и 0,1 г метилового красного растворяют в 180 мл этанола и доводят объём раствора водой до 200 мл.

Бромкрезоловый зеленый (синий) водорастворимый. $C_{21}H_{17}Br_4NO_5S$. (М.м. 715,0). 2-[(3,5-Дибром-4-гидрокси-2-метилфенил)(3,5-дибром-2-метил-4-оксоциклогекса-2,5-диен-1-илиден)метил]бензолсульфонат аммония.

Порошок черного цвета. Легко растворим в воде.

Переход окраски раствора от желтой к синей в интервале pH 3,8 – 5,4.

Раствор индикатора. 0,04 % раствор.

Бромкрезоловый пурпурный. [115-40-2]. $C_{21}H_{16}Br_2O_5S$. (М.м. 540,2).

3,3-Бис(3-бром-4-гидрокси-5-метилфенил)-3*H*-2,1λ^6-бензоксатиол-1,1-дион.

Порошок розоватого цвета.

Практически нерастворим в воде, растворим в спирте 96 % и разведённых растворах гидроксидов щелочных металлов.

Бромкрезолового пурпурного раствор 0,1 %.

0,1 г индикатора растворяют в 50 мл спирта 96 % при нагревании и после охлаждения доводят объём раствора водой до 100,0 мл.

Переход окраски раствора от желтой к пурпурной в интервале pH 5,2 – 6,8.

Бромкрезолового пурпурного раствор 0,05 %.

50 г бромкрезолового пурпурного растворяют в 0,92 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида и 20 мл спирта 96 %, доводят объём раствора водой до 100,0 мл.

Испытание на чувствительность. К 100 мл воды, свободной от углерода диоксида, прибавляют 0,2 мл раствора бромкрезолового пурпурного и 0,05 мл 0,02 М раствора натрия гидроксида; появляется синевато- фиолетовое окрашивание, которое переходит в желтое при прибавлении не более 0,2 мл 0,02 М раствора хлористоводородной кислоты.

Переход окраски от желтой до синевато-фиолетовой в интервале pH 5,2 – 6,8.

Бромкрезолового пурпурного раствор 0,04 %.

0,1 г индикатора растворяют в 9,25 мл 0,02 М раствора натрия гидроксида и доводят объём раствора свежепрокипяченной и охлажденной водой до 250 мл.

Переход окраски раствора от желтой к пурпурной в интервале pH 5,2 – 6,8.

Бромкрезоловый пурпурный водорастворимый. $C_{21}H_{19}Br_2NO_5S$. (М.м. 557,3).

2-[(3-Бром-4-гидрокси-5-метилфенил)(3-бром-5-метил-4-оксоциклогекса-2,5-диен-1-илиден)метил]бензолсульфонат аммония.

Мелкокристаллический порошок темно-красного или темно-коричневого цвета.

Легко растворим в воде.

Переход окраски раствора от желтой к пурпурной в интервале pH 5,2 – 6,8.

Раствор индикатора. 0,04 % раствор.

Бромтимоловый синий. [76-59-5]. $C_{27}H_{28}Br_2O_5S$. (М.м. 624,4).

3,3-Бис[3-бром-4-гидрокси-2-метил-5-(пропан-2-ил)фенил]-3*H*-2,1λ^6-бензоксатиол-1,1-дион.

Порошок от красновато-розового до коричневатого цвета.

Практически нерастворим в воде, растворим в спирте 96 % и разведённых растворах гидроксидов щелочных металлов.

Бромтимолового синего раствор 1 % в диметилформамиде. Раствор 10 г/л в диметилформамиде.

Бромтимолового синего раствор 0,15 %.

0,15 г бромтимолового синего и 0,15 г натрия карбоната безводного растворяют в воде и доводят водой до объёма 100 мл.

Бромтимолового синего раствор 0,1 % спиртовой.

0,1 г бромтимолового синего растворяют в 50 мл спирта 96 % при нагревании и после охлаждения доводят водой до объёма 100 мл.

Переход окраски от желтой к синей в интервале pH 6,0 – 7,6.

Бромтимолового синего раствор 0,05 %.

50 мг бромтимолового синего растворяют в смеси 4 мл 0,02 М раствора натрия гидроксида и 20 мл спирта 96 %, доводят объём раствора водой до 100,0 мл.

Испытание на чувствительность. К 100 мл воды, свободной от углерода диоксида, прибавляют 0,3 мл раствора бромтимолового синего; появляется желтое окрашивание, которое переходит в синее при прибавлении не более 0,1 мл 0,02 М раствора натрия гидроксида.

Переход окраски от желтой к синей в интервале pH 5,8 – 7,4.

Бромтимолового синего раствор 0,04 %.

0,1 г бромтимолового синего растворяют в 8 мл 0,02 М раствора натрия гидроксида и доводят объём раствора водой до 250,0 мл.

Переход окраски раствора от желтой к синей в интервале pH 6 – 7,6.

Бромтимолового синего раствор 0,04 % спиртовой.

К 0,1 г бромтимолового синего прибавляют 3,2 мл 0,05 М раствора натрия гидроксида и 5 мл спирта 90 %, нагревают до растворения, полученный раствор охлаждают и доводят спиртом 90 % до объёма 250 мл.

Бромтимоловый синий водорастворимый. $C_{27}H_{31}Br_2NO_5S$. (М.м. 641,4).

2-{3-Бром-4-гидрокси-2-метил-5-(пропан-2-ил)фенил)[3-бром-2-метил-4-оксо-5-(пропан-2-ил)циклогекса-2,5-диен-1-илиден]метил}бензолсульфонат аммония.

Мелкокристаллический порошок от темно-коричневого до черного цвета. Растворим в воде.

Переход окраски раствора от желтой к синей в интервале pH 6 – 7,6.

Раствор индикатора. 0,04 % раствор.

BRP индикатора раствор.

0,1 г бромтимолового синего, 20 мг метилового красного и 0,2 г фенолфталеина растворяют в спирте 96 %, доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл и фильтруют.

4-Бромфенацилбромид. [99-73-0]. $C_8H_6Br_2O$. (М.м. 277,94).

1-(4-Бромфенил)этан-1-он.

Содержит не менее 98 % $C_8H_6Br_2O$.

Грязно-белые кристаллы или порошок. Сильный лакриматор.

Практически нерастворим в воде, в щелочных растворах гидролизуется.

d_{20}^{20}. Около 1,848.

n_D^{20}. Около 1,603.

Температура плавления. 108–100 °С.

Хранить при температуре 2–8 °С.

Бромфеноловый синий. [115-39-9]. $C_{19}H_{10}Br_4O_5S$. (М.м. 670,0).

3,3-Бис(3,5-дибром-4-гидроксифенил)-3*H*-2,1λ^6-бензоксатиол-1,1-дион.

Порошок светлого оранжево-желтого цвета.

Очень мало растворим в воде, мало растворим в спирте 96 %, легко растворим в растворах гидроксидов щелочных металлов.

Бромфенолового синего раствор 0,2 % спиртовой.

0,2 г бромфенолового синего растворяют при нагревании в 3 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида и 10 мл спирта 96 %, полученный раствор охлаждают и доводят спиртом 96 % до 100,0 мл.

Бромфенолового синего раствор 0,1 %.

0,1 г бромфенолового синего растворяют в смеси 1,5 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида и 20 мл спирта 96 %, доводят объём раствора водой до 100,0 мл.

Испытание на чувствительность. К 20 мл воды, свободной от углерода диоксида, прибавляют 0,05 мл раствора бромфенолового синего и 0,05 мл 0,1 М раствора хлористоводородной кислоты; появляется желтое окрашивание, которое переходит в синевато-фиолетовое при прибавлении не более 0,1 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида.

Переход окраски от желтой до синевато-фиолетовой в интервале pH 2,8 – 4,4.

Бромфенолового синего раствор 0,05 %.

50 мг бромфенолового синего растворяют при осторожном нагревании в 3,73 мл 0,02 М раствора натрия гидроксида и доводят водой до 100,0 мл.

Бромфеноловый синий водорастворимый. $C_{19}H_{13}Br_4NO_5S$ (М.м. 687,0).

2-[(3,5-Дибром-4-гидроксифенил)(3,5-дибром-4-оксоциклогекса-2,5-диен-1-илиден)метил]бензолсульфонат аммония.

Мелкокристаллический порошок черного цвета.

Легко растворим в воде.

Переход окраски раствора от желтой к синей в интервале pH 3 – 4,6.

Раствор индикатора. 0,04 % раствор.

Бруцин. [357-57-3]. $C_{23}H_{26}N_2O_4 \cdot 2H_2O$. (М.м. 430,5).

2,3-Диметоксистрихнидин-10-он дигидрат.

Бесцветные кристаллы.

Мало растворим в воде, легко растворим в спирте 96 % и эфире.

Температура плавления. Около 178 °С.

Бура. См. **Натрия тетраборат**.

Бутановая кислота. См. **Масляная кислота**.

Бутанол. [71-36-3]. $C_4H_{10}O$. (М.м. 74,12). Бутан-1-ол.

Прозрачная, бесцветная жидкость.

Растворим в воде, смешивается со спиртом 96 %, эфиром.

d_{20}^{20}. Около 0,81.

Температура кипения. От 116 до 119 °С.

2-Бутанол. [78-92-2]. $C_4H_{10}O$. (М.м. 74,12). Бутан-2-ол.

Прозрачная, бесцветная жидкость.

Легко растворим в воде, смешивается со спиртом 96 % и эфиром.

d_{20}^{20}. Около 0,81.

Температурные пределы перегонки. От 99 до 100 °С; должно перегоняться не менее 95 %.

***трет*-Бутанол**. См. **2-Метил-2-пропанол**.

2-Бутанон. См. **Метилэтилкетон**.

Бутиламин. [109-73-9]. $C_4H_{11}N$. (М.м. 73,14). Бутан-1-амин.

Бесцветная жидкость. Смешивается с водой, спиртом 96 % и эфиром.

n_D^{20}. Около 1,401.

Температура кипения. Около 78 °С.

Перегоняют и используют в течение 1 мес.

***трет*-Бутиламин**. См. **1,1-диметилэтиламин**.

Бутилацетат. [123-86-4]. $C_6H_{12}O_2$. (М.м. 116,16). Бутилацетат.

Прозрачная, бесцветная, воспламеняющаяся жидкость.

Мало растворим в воде, смешивается со спиртом 96 % и эфиром.

d_{20}^{20}. Около 0,883.

n_D^{20}. Около 1,395.

Температурные пределы перегонки. От 123 до 126 °С; должно перегоняться не менее 95 %.

Бутанол. Не более 0,2 %. Определение проводят методом газовой хроматографии.

Бутилформиат. Не более 0,1 %. Определение проводят методом газовой хроматографии.

Бутилпропионат. Не более 0,1 %. Определение проводят методом газовой хроматографии.

Вода. Не более 0,1 %.

Количественное определение. Не менее 99,5 % $C_6H_{12}O_2$. Определение проводят методом газовой хроматографии.

Бутилбороновая кислота. [4426-47-5]. $C_4H_{11}BO_2$. (М.м. 101,94).

Бутилбороновая кислота.

Содержит не менее 98 % $C_4H_{11}BO_2$.

Температура плавления. От 90 до 92 °С.

***трет*-Бутилгидроксипероксид**. См. ***трет*-Бутилгидропероксид**.

Бутилгидрокситолуол. [128-37-0]. $C_{15}H_{24}O$. (М.м. 220,35).

2,6-Ди(*трет*-бутил)-4-метилфенол.

Белый или желтовато-белый кристаллический порошок.

Практически нерастворим в воде, очень легко растворим в ацетоне и эфире, легко растворим в спирте 96 % и растительных маслах.

1,3-Бутиленгликоль. [107-88-0]. $C_4H_{10}O_2$. (М.м. 90,12).

(3*RS*)-Бутан-1,3-ол.

Бесцветная вязкая жидкость.

Растворим в воде, спиртах, ацетоне, умеренно растворим в эфире, хлорбензоле, четырёххлористом углероде, мало растворим в неполярных растворителях.

d_{20}^{20}. Около 1,005.

n_D^{20}. Около 1,441.

Температура кипения. 203–204 °С.

Температура плавления. –77 °С.

***трет*-Бутилгидропероксид**. [75-91-2]. $C_4H_{10}O_2$. (М.м. 90,12).

2-Метилпропан-2-пероксол.

Воспламеняющаяся жидкость.

Растворим в органических растворителях.

d_{20}^{20}. Около 0,898.

n_D^{20}. Около 1,401.

Температура кипения. 35 °С.

***трет*-Бутилметиловый эфир**. См. **1,1-Диметилэтилметиловый эфир**.

Бутилпарагидроксибензоат. [94-26-8]. $C_{11}H_{14}O_3$. (М.м. 194,23).

Бутил(4-гидроксибензоат).

Белый или почти белый кристаллический порошок или бесцветные кристаллы.

Очень мало растворим в воде, легко растворим в спирте 96 %.

Температура плавления. От 68 до 71 °С.

***трет*-Бутиловый спирт**. См. **2-Метил-2-пропанол**.

Бутиролактон. [96-48-0]. $C_4H_6O_2$. (М.м. 86,09).

Оксолан-2-он.

Маслянистая жидкость.

Смешивается с водой, растворим в метаноле, эфире, ацетоне, бензоле и четыреххлористом углероде.

n_D^{25}. Около 1,435.

Температура кипения. Около 204 °С.

Буферные рабочие и образцовые растворы для электрофореза. См. **Натрия лаурилсульфат**.

Вазелин.

Полужидкая смесь углеводородов, полученная из нефти и обесцвеченная. Практически нерастворим в воде и спирте 96 %, растворим в эфире и петролейном эфире; раствор иногда обнаруживает слабую опалесценцию.

Вазелиновое масло.

Бесцветная прозрачная маслянистая жидкость, без флуоресценции при дневном освещении.

Практически нерастворимо в воде, умеренно растворимо в спирте 96 %, смешивается с углеводородами.

Валереновая кислота. [3569-10-6]. $C_{15}H_{22}O_2$. (М.м. 234,33).

(2*E*)-3-[(4*S*,7*R*,7a*R*)-3,7-Диметил-2,4,5,6,7,7а-гексагидро-1*H*-инден-4-ил]-2-метилпроп-2-еновая кислота.

Температура плавления от 134 до 138 °С.

Валериановая кислота. [109-52-4]. $C_5H_{10}O_2$. (М.м. 102,13). Пентановая кислота.

Бесцветная жидкость.

Растворима в воде, легко растворима в спирте 96 % и эфире.

d_{20}^{20}. Около 0,94.

n_D^{20}. Около 1,409.

Температура кипения. Около 186 °С.

Ванадия(V) оксид. [1314-62-1]. V_2O_5. (М.м. 181,88). Оксид ванадия(V).

Содержит не менее 98,5 % V_2O_5.

Порошок от желто-коричневого до оранжевато-коричневого цвета.

Мало растворим в воде, растворим в концентрированных неорганических кислотах и разведённых растворах гидроксидов щелочных металлов с образованием солей.

Ванилин. [121-33-5]. $C_8H_8O_3$. (М.м. 152,15).

4-Гидрокси-3-метоксибензальдегид.

Белые или слабо-желтоватые иглы с запахом ванили, темнеющие на воздухе. Очень мало растворим в воде, легко растворим в спирте 96 %, эфире и хлороформе.

Температура плавления. От 81 до 83 °С.

Ванилина раствор 5 % в спирте 96 %.

5,0 г ванилина растворяют в спирте 96 % и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл.

Ванилина раствор 3 % в спирте 96 %.

3,0 г ванилина растворяют в спирте 96 % и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл.

Ванилина раствор 2 % в хлористоводородной кислоте.

0,2 г ванилина растворяют в 10 мл хлористоводородной кислоты концентрированной. Используют свежеприготовленным.

Ванилина раствор 1 % в серной кислоте.

0,1 г ванилина растворяют в 10 мл серной кислоты концентрированной. Используют свежеприготовленным.

Ванилина раствор 1 % в спирте 96 %.

1,0 г ванилина растворяют в спирте 96 % и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл.

Ванилина раствор 1 % в хлорной кислоте разведённой 10 %.

0,1 г ванилина растворяют в 10 мл хлорной кислоты разведённой 10 %.

Используют свежеприготовленным.

Ванилина раствор 0,0005 %.

0,5 мг ванилина растворяют в 10,0 мл уксусной кислоты ледяной, прибавляют 85,0 мл спирта 96 % и 5,0 мл серной кислоты концентрированной.

Срок годности раствора 30 суток при хранении в прохладном, защищённом от света месте.

Ванилина раствор в фосфорной кислоте.

1,0 г ванилина растворяют в 25 мл спирта 96 %, прибавляют 25 мл воды и 35 мл фосфорной кислоты концентрированной.

Ванилина реактив.

К 100 мл 1 % раствора ванилина в спирте 96 % осторожно по каплям прибавляют 2 мл серной кислоты концентрированной.

Срок годности 2 сут.

Вератровая кислота. [93-07-2]. $C_9H_{10}O_4$. (М.м. 150,17).

3,4-Диметоксибензойная кислота.

Содержит не менее 99 % $C_9H_{10}O_4$.

Мало растворима воде, растворима в спирте 96 % и эфире.

Температура кипения. От 179 до 182 °С.

Винилацетат. [108-05-4]. $C_4H_6O_2$. (М.м. 86,09).

Этенилацетат.

Бесцветная жидкость.

Умеренно растворим воде; смешивается с этанолом и эфиром.

d_{20}^{20}. Около 0,930.

Температура кипения. Около 72 °С.

Винил-*н*-бутиловый эфир. [111-34-2]. $C_6H_{12}O$. 100,16.

1-(Этенилокси)бутан.

Хранить при температуре 2–8 °С.

d_{20}^{20}. *Около 0,778.*

n_D^{20}. *Около 1,400.*

Температура кипения 94 °С.

2-Винилпиридин. [100-69-6]. C_7H_7N. (М.м. 105,14).

2-Этенилпиридин.

Жидкость желтого цвета. Смешивается с водой.

d_{20}^{20}. Около 0,97.

n_D^{20}. Около 1,549.

Температура кипения 159 °С.

1-Винилпирролидин-2-он. [88-12-0]. C_6H_9NO. (М.м. 111,14).

1-Этенилпирролидин-2-он.

Содержит не менее 99,0 % C_6H_9NO.

Прозрачная, бесцветная жидкость.

Вода. Не более 0,1 % (полумикрометод).

Определение проводят из 2,5 г, используя в качестве растворителя смесь 50 мл метанола безводного и 10 мл бутиролактона.

Количественное определение. Проводят методом газовой хроматографии.

Хроматографирование проводят на газовом хроматографе с пламенно-ионизационным детектором в следующих условиях:

- колонка кварцевая капиллярная размером 30 м × 0,5 мм, покрытая слоем макрогола 20 000 толщиной 1,0 мкм;
- газ-носитель гелий для хроматографии;
- температура блока ввода пробы 190 °С;
- температуру колонки программируют следующим образом: выдерживают температуру 80 °С в течение 1 мин, затем повышают до 190 °С со скоростью 10 °С в мин и выдерживают температуру 190 °С в течение 15 мин.

Хроматографируют 0,3 мкл испытуемого вещества, регулируя скорость потока газа-носителя таким образом, чтобы время удерживания основного вещества, составляло около 17 мин. Содержание C_6H_9NO определяют методом внутренней нормализации.

Винилполимер октадецилсилильный для хроматографии.

Сферические частицы (5 мкм) сополимера винилового спирта, связанного октадецилсиланом.

Содержит 17 % углерода.

Винилхлорид. [75-01-4]. C_2H_3Cl. (М.м. 62,50). Хлорэтен.

Бесцветный газ.

Мало растворим в органических растворителях.

Винная кислота. [87-69-4]. $C_4H_6O_6$. (М.м. 150,09).

(2*R*,3*R*)-Дигидроксибутандиовая кислота.

Бесцветные кристаллы.

Легко растворима в воде, спирте 96 %, растворима в ацетоне, мало растворима в эфире.

Винной кислоты раствор 20 %.

2 г винной кислоты растворяют в 10 мл воды. Используют свежеприготовленным.

Висмута нитрат. [10035-06-0]. $Bi(NO_3)_3 \cdot 5H_2O$. (М.м. 485,1). Нитрат висмута(III), пентагидрат.

Прозрачные бесцветные кристаллы в массе белого цвета. Реагирует с водой. Легко растворим в азотной кислоте.

Висмута нитрат основной. [1304-85-4]. $Bi_4BiO(NO_3)_4(OH)_9$. (М.м. 1462). Тетранитрат-нонагидроксид тетрависмута-оксидовисмута(1+).

Содержит не менее 71,5 % и не более 74,0 % висмута; не менее 14,5 % и не более 16,5 % нитрата, в пересчете на азота(V) оксид (N_2O_5).

Порошок белого цвета.

Практически нерастворим в воде.

Висмута нитрата основного раствор.

5 г висмута нитрата основного растворяют в смеси 8,4 мл азотной кислоты концентрированной и 50 мл воды, доводят объём раствора водой до 250 мл и, если необходимо, фильтруют.

Кислотность. К 10 мл висмута нитрата основного раствора прибавляют 0,05 мл 0,1 % спиртового раствора метилового оранжевого; окраска раствора

должна измениться при прибавлении от 5,0 мл до 6,25 мл 1 М раствора натрия гидроксида.

Вода. [7732-18-5]. См. ФС **Вода очищенная**.

Вода деионизированная. См. **Вода для хроматографии.**

Вода для инъекций. См. ФС **Вода для инъекций**.

Вода для хроматографии.

Деионизированная вода, имеющая сопротивление не менее 0,18 Мом·м.

Вода, свободная от аммиака.

К 100 мл воды прибавляют 0,1 мл серной кислоты концентрированной, перегоняют, используя прибор для определения температурных пределов перегонки, отбрасывают первые 10 мл и собирают следующие 50 мл.

Вода, свободная от нитратов.

К 100 мл воды прибавляют несколько миллиграммов калия перманганата и бария гидроксида; перегоняют, используя прибор для определения температурных пределов перегонки, отбрасывают первые 10 мл и собирают следующие 50 мл.

Вода, свободная от углерода диоксида.

Воду кипятят в течение нескольких минут, охлаждают.

Хранят, защищая от атмосферного воздействия.

Вода, свободная от частиц.

Воду фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,22 мкм.

Вода хлорная.

Содержит хлор, хлорноватистую кислоту и хлористый водород.

Получают пропусканием газообразного хлора через воду до насыщения при комнатний температуре.

Хранят в прохладном, защищённом от света месте.

Водород для хроматографии. [1333-74-0]. H_2. (М.м. 2,016).

Содержит не менее 99,95 % (о/о) H_2.

Водорода пероксид. [7722-84-1]. H_2O_2. (М.м. 34,01). Пероксид водорода. Водорода пероксида раствор концентрированный.

Содержание H_2O_2 в реактиве «х.ч.» – не менее 30 и не более 35 %; «ч.д.а.» – не менее 29 и не более 32 %; «ч.» – не менее 29 %.

Бесцветная прозрачная жидкость без запаха или со слабым своеобразным запахом, слабокислой реакции, легко разлагающаяся с выделением кислорода.

Водорода пероксида раствор разведённый. Раствор перекиси водорода. 10 г водорода пероксида растворяют в воде и доводят объём раствора водой до 100,0 мл.

Восстанавливающая смесь.

Для получения однородной смеси последовательно смешивают предварительно измельченные реактивы: 20 мг калия бромида, 0,5 г гидразина сульфата и 5 г натрия хлорида.

Гадолиния сульфат октагидрат. [13450-87-8]. $Gd_2(SO_4)_3 \cdot 8H_2O$. (М.м. 746,8). Сульфата гадолиния(III) октагидрат.

Содержит не менее 99,9 % $Gd_2(SO_4)_3 \cdot 8H_2O$.

Бесцветное кристаллическое вещество.

Растворимость в холодной воде около 3%, в горячей – около 2,5%.

Гадолиния хлорид безводный. [10138-52-0]. $GdCl_3$. (М.м. 263,61).

Хлорид гадолиния(III).

Содержит не менее 99,99 % $GdCl_3$.

Бесцветное кристаллическое вещество.

Растворим в воде.

Галактоза. [59-23-4]. $C_6H_{12}O_6$. (М.м. 180,16). D-Галактопираноза.

Кристаллический порошок белого цвета. Легко растворима в воде.

$[\alpha]_D^{20}$. От + 79° до + 81° (10 % раствор в воде, содержащей около 0,05 % NH_3).

Галловая кислота. [5995-86-8]. $C_7H_6O_5 \cdot H_2O$. (М.м. 188,13).

3,4,5-Тригидроксибензойная кислота, моногидрат.

Кристаллический порошок или длинные игольчатые кристаллы, бесцветные или слегка желтоватого цвета.

Растворима в воде, легко растворима в горячей воде, спирте 96 % и глицерине, мало растворима в эфире.

Галловая кислота теряет кристаллизационную воду при температуре 120 °С и плавится при температуре около 260 °С с разложением.

Гарпагозид. [19210-12-9]. $C_{24}H_{30}O_{11}$. (М.м. 494,5).

[(1*S*,4a*S*,5*R*,7*S*,7a*S*)-4a,5-Дигидрокси-1-(β-D-глюкопиранозилокси)-7-метил-1,4a,5,6,7,7a-гексагидроциклопента[*c*]пиран-7-ил]-(2*E*)-3-фенилпроп-2-еноат.

Кристаллический порошок белого цвета, очень гигроскопичен.

Растворим в воде и спирте 96 %.

Температура плавления. От 117 до 121 °С.

Хранят в воздухонепроницаемой упаковке.

Гвайазулен. [489-84-9]. $C_{15}H_{18}$. (М.м. 198,30).

1,4-Диметил-7-(пропан-2-ил)азулен.

Кристаллы темно-синего цвета или жидкость синего цвета.

Очень мало растворим в воде, смешивается с жирными и эфирными маслами и вазелиновым маслом, умеренно растворим в спирте 96 %, растворим в 50 % растворе серной кислоты и 80 % (м/м) фосфорной кислоте с образованием бесцветного раствора.

Температура плавления. Около 30 °С.

Хранят в защищенном от света и воздуха месте.

Гваяковая смола.

Смола, полученная из сердцевины дерева *Guaiacum officinale* L. и *Guaiacum sanctum* L.

Твердые, гладкие фрагменты красновато-коричневого или зеленовато-коричневого цвета, блестят на изломе. При нагревании размягчается.

Практически нерастворим в воде.

Гексадиметрина бромид. [28728-55-4]. $(C_{13}H_{30}Br_2N_2)_n$.

Поли(1,1,5,5-тетраметил-1,5-диазаундекан-1,5-диий-1,11-диил дибромид).

Аморфный порошок белого цвета, гигроскопичен.

Растворим в воде.

Хранят в воздухонепроницаемой упаковке.

Гексакозан. [630-01-3]. $C_{26}H_{54}$. (М.м. 366,70). Гексакозан.

Бесцветные или белого цвета хлопья.

Практически нерастворим в воде, растворим в этаноле и эфире.

Температура плавления. Около 57 °С.

Гексаметилдисилазан. [999-97-3]. $C_6H_{19}NSi_2$. (М.м. 161,39).

Si,*Si*,*Si*-Триметил-*N*-(триметилсилил)силан-1-амин.

Прозрачная, бесцветная жидкость.

d_{20}^{20}. Около 0,78.

n_D^{20}. Около 1,408.

Температура кипения. Около 125 °С.

Хранят в воздухонепроницаемой упаковке.

Гексаметилентетрамин. [100-97-0]. $C_6H_{12}N_4$. (М.м. 140,19).

1,3,5,7-Тетраазатрицикло[3.3.1.$1^{3,7}$]декан.

Бесцветный кристаллический порошок.

Очень легко растворим в воде.

Гексан. [110-54-3]. C_6H_{14}. (М.м. 86,18). Гексан.

Бесцветная, воспламеняющаяся жидкость.

Практически нерастворим в воде, смешиваетсяс этанолом и эфиром.

d_{20}^{20}. От 0,659 до 0,663.

n_D^{20}. От 1,375 до 1,376.

Температурные пределы перегонки. От 67 до 69 °С; должно перегоняться не менее 95 %.

Гексан, используемый в спектрофотометрии, должен выдерживать следующее дополнительное испытание.

Минимальное пропускание. 97 %. Определение проводят в области длин волн от 260 до 420 нм, используя в качестве раствора сравнения воду.

Гексафторизопропанол. $C_3H_2F_6O$. [920-66-1]. (М.м. 168,04).

1,1,1,3,3,3-Гексафторопропан-2-ол.

Бесцветная прозрачная жидкость, смешивающаяся с водой и безводным спиртом.

d_{20}^{20}. Около 1,596.

Температура кипения. Около 59 °С.

Гексахлорбензол. [118-74-1]. C_6Cl_6. (М.м. 284,78).

Гексахлорбензол.

Бесцветные кристаллы.

Практически нерастворим в воде, мало растворим в спирте и бензоле.

Температура кипения. Около 323 – 326 °С.

Температура плавления. Около 230 °С.

α-Гексахлорциклогексан. [319-84-6]. $C_6H_6Cl_6$. (М.м. 290,83).

rac-(1*R*,2*R*,3*R*,4*R*,5*S*,6*S*)-1,2,3,4,5,6-Гексахлорциклогексан.

Белый порошок.

Температура кипения. Около 288 °С.

Температура плавления. Около 158 °С.

β-Гексахлорциклогексан. [319-85-7]. $C_6H_6Cl_6$. (М.м. 290,83).

(1*r*,2*r*,3*r*,4*r*,5*r*,6*r*)-1,2,3,4,5,6-Гексахлорциклогексан.

Белый порошок.

Температура плавления. Более 300 °С.

γ-Гексахлорциклогексан. См. **Линдан**.

δ-Гексахлорциклогексан. [319-86-8]. $C_6H_6Cl_6$. (М.м. 290,83).

(1*R*,2*R*,3*r*,4*S*,5*S*,6*s*)-1,2,3,4,5,6-Гексахлорциклогексан.

Белый порошок.

Температура плавления. Около 140 °С.

Гексиламин. [111-26-2]. $C_6H_{15}N$. (М.м. 101,19). Гексан-1-амин.

Бесцветная жидкость.

Мало растворим в воде, растворим в спирте 96 % и эфире.

d_{20}^{20}. Около 0,766.

n_D^{20}. Около 1,418.

Температура кипения. От 127 до 131 °С.

Гелий для хроматографии. [7440-59-7]. He. (А.м. 4,003). Гелий.

Содержит не менее 99,995 % (о/о) He.

Гептан. [142-82-5]. C_7H_{16}. (М.м. 100,20). Гептан.

Бесцветная, воспламеняющаяся жидкость.

Растворим в хлороформе, практически нерастворим в воде, смешивается с этанолом и эфиром.

d_{20}^{20}. От 0,683 до 0,686.

n_D^{20}. От 1,387 до 1,388.

Температурные пределы перегонки. От 97 до 98 °С; должно перегоняться не менее 95 %.

Гептафтормасляная кислота. [375-22-4]. $C_4HF_7O_2$. (М.м. 214,04).

Перфтормасляная кислота.

Бесцветная прозрачная жидкость.

d_{20}^{20}. Около 1,645.

n_D^{20}. Около 1,300.

Температура кипения. 120 °С.

Гептахлорэпоксид. [1024-57-3]. $C_{10}H_5Cl_7O$. (М.м. 389,32).

(1a*S*,2*R*,5*R*,6*R*,6a*S*)-2,3,4,5,6,7,7-Гептахлор-1b,2,5,5a,6,6a-гексагидро-1a*H*-2,5-метаноиндено[1,2-*b*]оксирен.

Температура кипения. 425,5 °С.

Температура плавления. 160 – 161,5 °С.

Гераниола ацетат. [105-87-3]. $C_{12}H_{20}O_2$. (М.м. 196,29).

[(3*E*)-3,7-Диметилокта-2,6-диен-1-ил]ацетат.

Бесцветная или слабо-желтого цвета жидкость, со слабым запахом розы и лаванды.

Очень мало растворим в воде, легко растворим в этаноле; смешивается с эфиром.

d_{25}^{25}. От 0,896 до 0,913.

n_D^{15}. Около 1,463.

Температура кипения. Около 138 °С.

Хроматографическая чистота гераниола ацетата, используемого в газовой хроматографии, должна быть не менее 99,0 %.

Гидразина дигидрохлорид. [5341-61-7]. $NH_2NH_2 \cdot 2HCl$. (М.м. 104,97).

Дигидрохлорид гидразина.

Белый кристаллический порошок.

Очень легко растворим в воде, мало растворим в спирте 96 %. Ядовит.

Гидразина сульфат. [10034-93-2]. $NH_2NH_2 \cdot H_2SO_4$. (М.м. 130,12).

Сульфат гидразина.

Бесцветные кристаллы.

Умеренно растворим в холодной воде, растворим в горячей воде (50 °С) и легко растворим в кипящей воде, практически нерастворим в спирте 96 %.

4-Гидроксибензойная кислота. [99-96-7]. $C_7H_6O_3$. (М.м. 138,12).

4-Гидроксибензойная кислота.

Кристаллический порошок.

Очень мало растворима в воде, очень легко растворима в спирте 96 %, растворима в ацетоне и эфире.

Температура плавления. От 214 до 215 °С.

4-Гидроксиизофталевая кислота. [636-46-4]. $C_8H_6O_5$. (М.м. 182,13).

4-Гидроксибензол-1,3-дикарбоновая кислота.

Игольчатые или в виде пластинок кристаллы.

Очень мало растворима в воде, легко растворима в спирте 96 % и эфире.

Температура плавления. Около 314 °С с разложением.

Гидроксиламина гидрохлорид. [5470-11-1]. $NH_2OH \cdot HCl$. (М.м. 69,49).

Гидрохлорид гидроксиламина.

Кристаллический порошок белого цвета.

Очень легко растворим в воде, растворим в спирте 96 %.

Гидроксиламина гидрохлорида раствор 2 М.

69,5 г гидроксиламина гидрохлорида растворяют в воде и доводят объём раствора водой до 500,0 мл. Раствор хранят при температуре 4 – 8 °С в течение 1 мес.

Гидроксиламина гидрохлорида раствор 1 М.

6,95 г гидроксиламина гидрохлорида растворяют в 50 мл воды и доводят объём раствора водой до 100,0 мл. Раствор хранят при температуре 4 – 8 °С в течение 1 мес.

Гидроксиламина гидрохлорида раствор спиртовой 0,5 М.

3,48 г гидроксиламина гидрохлорида растворяют в 95 мл спирта 60 % (о/о), прибавляют 0,5 мл 0,2 % раствора метилового оранжевого в спирте 60 % (о/о) и достаточное количество 0,5 М раствора калия гидроксида в спирте 60 % (о/о) до получения четкого желтого окрашивания, доводят спиртом 60 % (о/о) до 100,0 мл.

Гидроксиламина гидрохлорида раствор 14 %.

14,0 г гидроксиламина гидрохлорида растворяют в 60 мл воды и доводят объём раствора водой до 100,0 мл.

Гидроксиламина гидрохлорида раствор 10 %.

10,0 г гидроксиламина гидрохлорида растворяют в 60 мл воды и доводят объём раствора водой до 100,0 мл.

Гидроксиламина щелочной раствор 7 %.

Непосредственно перед использованием смешивают равные объёмы 14 % раствора гидроксиламина гидрохлорида и 15 % раствора натрия гидроксида.

Гидроксиламина щелочной раствор 5 %. 10 % раствор гидроксиламина гидрохлорида смешивают с 10 % раствором натрия гидроксида в соотношении 1:2 (по объёму).

Гидроксиламина гидрохлорида раствор 1 %.

1,0 г гидроксиламина гидрохлорида растворяют в 60 мл воды и доводят объём раствора водой до 100,0 мл.

Гидроксиламина раствор щелочной в метаноле.

Раствор А. 12,5 г гидроксиламина гидрохлорида растворяют в метаноле и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл.

Раствор Б. 12,5 г натрия гидроксида растворяют в метаноле и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл.

Непосредственно перед использованием смешивают равные объёмы растворов А и Б.

Гидроксиламина гидрохлорида раствор спиртовой 5 %.

2,5 г гидроксиламина гидрохлорида растворяют в 4,5 мл горячей воды, прибавляют 40 мл спирта 96 %, 0,4 мл 0,2 % спиртового раствора бромфенолового синего и достаточное количество 0,5 М спиртового раствора калия гидроксида до зеленовато-желтого окрашивания, доводят объём раствора спиртом 96 % до 50,0 мл.

Гидроксиламина сульфат. [10039-54-0]. $(NH_2OH)_2 \cdot H_2SO_4$. (М.м. 164,14).

Сульфат гидроксиламина (1:2).

Бесцветные кристаллы.

Легко растворим в воде, растворим в эфире, нерастворим в спирте 96 %.

Гидроксиметилфурфурол. [67-47-0]. $C_6H_6O_3$. (М.м. 126,11).

5-(Гидроксиметил)фуран-2-карбальдегид.

Игольчатые кристаллы.

Легко растворим в воде, ацетоне и спирте 96 %, растворим в эфире.

Температура плавления. Около 32 °С.

Гидроксинафтолового синего натриевая соль. [63451-35-4]. $C_{20}H_{11}N_2Na_3O_{11}S_3$.

(М.м. 620,5).

3-Гидрокси-4-[(2-гидрокси-4-сульфонатонафталин-1-ил)диазенил]нафталин-2,7-дисульфонат тринатрия.

12-Гидроксистеариновая кислота. [106-14-9]. $C_{18}H_{36}O_3$. (М.м. 300,48).

12-Гидроксиоктадекановая кислота.

Порошок белого цвета.

Практически нерастворима в воде, растворима в этаноле, хлороформе и эфире.

Температура плавления. От 71 до 74 °С.

5-Гидроксиурацил. [496-76-4]. $C_4H_4N_2O_3$. (М.м. 128,09).

Пиримидин-2,4,5-триол.

Кристаллический порошок белого цвета.

Температура плавления. Около 310 °С с разложением.

Хранят в воздухонепроницаемой упаковке.

Гидроксихинолин. [148-24-3]. C_9H_7NO. (М.м. 145,16). Хинолин-8-ол.

Кристаллический порошок белого или желтоватого цвета.

Легко растворим в спирте 96 %, растворим в ацетоне, хлороформе, бензоле, мало растворим в воде, эфире. Растворяется в растворах неорганических кислот и разведённых растворах гидроксидов щелочных металлов.

Температура плавления. Около 75 °С.

Сульфатная зола. Не более 0,05 %.

Гидроксихинолина раствор 5 %. 5 г гидроксихинолина растворяют в 100 мл 2 М раствора уксусной кислоты.

Гидрохинон. [123-31-9]. $C_6H_6O_2$. (М.м. 110,11). Бензол-1,4-диол.

Бесцветные или белого цвета, игольчатые, мелкие кристаллы, темнеющие под действием воздуха и света.

Растворим в воде, спирте 96 % и эфире.

Температура плавления. Около 173 °С.

Хранят в защищенном от света и воздуха месте.

Гиперозид. [482-36-0]. $C_{21}H_{20}O_{12}$. (М.м. 464,4).

(β-D-Галактопиранозилокси)-5,7-дигидрокси-3-2-(3,4-дигидроксифенил)-4*H*-1-бензопиран-4-он.

Игольчатые кристаллы светло-желтого цвета.

Растворим в метаноле.

$[\alpha]_D^{20}$. – 8,3° (0,2 % раствор в пиридине).

Температура плавления. Около 240 °С с разложением.

Гипоксантин. [68-94-0]. $C_5H_4N_4O$. (М.м. 136,11).

1,7-Дигидро-6*H*-пурин-6-он.

Кристаллический порошок белого цвета.

Очень мало растворим в воде, умеренно растворим в кипящей воде, растворим в разведённых растворах неорганических кислот и разведённых растворах гидроксидов щелочных металлов.

Разлагается, не плавясь, при температуре около 150 °С.

Гипофосфита реактив. См. **Натрия гипофосфита раствор**.

Гипс. **См**. **Кальция сульфат**.

Гистамин. [51-45-6]. $C_5H_9N_3$. (М.м. 111,15).

2-(4-Имидазолил)этан-1-амин.

Бесцветные кристаллы.

Растворим в воде и спирте.

Температура кипения. 209,5 °С.

Температура плавления. 83,5 °С.

Гистамина дигидрохлорид. [56-92-8]. $C_5H_9N_3 \cdot 2HCl$. (М.м. 184,07).

2-(4-Имидазолил)этан-1-амина дигидрохлорид.

Гистамина фосфат. [23297-93-0]. $C_5H_9N_3 \cdot 2H_3PO_4$. (М.м. 307,14).

2-(4-Имидазолил)этан-1-амина дифосфат.

Гистидина гидрохлорид моногидрат. [123333-71-1]. $C_6H_9N_3O_2 \cdot HCl \cdot H_2O$. М.м. 209,63.

(2*RS*)-2-Амино-3-(имидазол-4-ил)пропановой кислоты гидрохлорид, моногидрат.

Бесцветные кристаллы или кристаллический порошок.

Растворим в воде.

Температура плавления. Около 250 °С с разложением.

Гликокол. См. **Глицин**.

Гликолевая кислота. [79-14-1]. $C_2H_4O_3$. (М.м. 76,05). Гидроксиуксусная кислота.

Бесцветные кристаллы.

Растворима в воде, ацетоне, спирте 96 %, эфире и метаноле.

Температура плавления. Около 80 °С.

Глиоксальгидроксианил. [1149-16-2]. $C_{14}H_{12}N_2O_2$. (М.м. 240,26).

2,2'-[Этан-1,2-диилиденди(нитрило)]дифенол.

Кристаллы белого цвета.

Растворим в горячем спирте 96 %.

Температура плавления. Около 200 °С.

Глиоксаля раствор 40 %. [107-22-2]. Содержит около 40 % (м/м) глиоксаля.

Количественное определение. Около 1,0 г раствора глиоксаля (точная навеска) помещают в колбу с притертой стеклянной пробкой, прибавляют 20 мл 7 % раствора гидроксил-амина гидрохлорида и 50 мл воды, выдерживают в течение 30 мин и титруют 1 М раствором натрия гидроксида до перехода окраски от красной к зеленой, используя в качестве индикатора 1 мл смешанного раствора метилового красного. Параллельно проводят контрольный опыт.

1 мл 1 М раствора натрия гидроксида соответствует 29,02 мг глиоксаля ($C_2H_2O_2$).

Глицерин. [56-81-5]. $C_3H_8O_3$. (М.м. 92,09). Пропан-1,2,3-триол.

Содержит не менее 98,0 % и не более 101,0 % пропан-1,2,3-триола в расчете на безводную субстанцию.

Бесцветная прозрачная густая жидкость; гигроскопична.

Смешивается с водой, спиртом 96 %, мало растворим в ацетоне, практически нерастворим в эфире.

Глицерин 85 %. Водный раствор, содержащий не менее 83,5 % (м/о) и не более 88,5 % (м/о) пропан-1,2,3-триола.

Сиропообразная жидкость, бесцветная или почти бесцветная, прозрачная, очень гигроскопичная.

Смешивается с водой и спиртом 96 %, мало растворим в ацетоне, практически нерастворим в эфире, жирных и эфирных маслах.

Глицерина раствор 33 %.

33 мл глицерина разбавляют водой до 100 мл и прибавляют крупинку камфоры или 1 каплю жидкого фенола.

L-α-Глицерофосфорилхолин. [28319-77-9]. $C_8H_{20}NO_6P$. (М.м. 257,22).

(2*R*)-1,2-Дигидрокси-9,9-диметил-5-оксо-4,6-диокса-9-аза-5λ^5-фосфадекан-9-ий-5-олат.

Содержит не менее 98 % $C_8H_{20}NO_6P$.

$[\alpha]_D^{20}$. – 2,8° (2,6 % раствор в воде, pH 5,8).

Температура плавления. Около 143 °С.

Хранить при температуре –20 °С.

Глицин. [56-40-6]. $C_2H_5NO_2$. (М.м. 75,07). Аминоуксусная кислота.

Белый кристаллический порошок.

Легко растворим в воде; нерастворим в эфире; очень мало растворим в спирте 96 %.

Температура плавления. Около 234 °С с разложением.

Глицирретиновая кислота. [471-53-4]. $C_{30}H_{46}O_4$. (М.м. 470,7).

3β-Гидрокси-11-оксоолеан-12-ен-30-овая кислота.

Смесь α- и β-глицирретиновых кислот, в которой преобладает β-изомер.

Порошок от белого до желтовато-коричневатого цвета.

Практически нерастворима в воде, растворима в этаноле и уксусной кислоте ледяной.

$[\alpha]_D^{20}$. От + 145° до + 155° (1 % раствор в этаноле).

Хроматография. Определение проводят методом тонкослойной хроматографии, используя в качестве тонкого слоя силикагель GF_{254}, суспензию которого готовят, используя раствор 0,25 % (о/о) фосфорной кислоты. На хроматографическую пластинку наносят 5 мкл 0,5 % раствора глицирретиновой кислоты в смеси равных объёмов хлороформа и метанола. Хроматографируют в смеси растворителей метанол – хлороформ 5:95. Когда фронт растворителей пройдет 10 см, хроматограмму просматривают в УФ-свете при длине волны 254 нм. На хроматограмме должно обнаруживаться темное пятно (R_f около 0,3), соответствующее β-глицирретиновой кислоте, и меньшее пятно (R_f около 0,5), соответствующее α-глицирретиновой кислоте.

Пластинку опрыскивают раствором анисового альдегида и нагревают при температуре от 100 до 105 °C в течение 10 мин. Оба пятна должны быть окрашены в синевато-фиолетовый цвет; между ними допускается наличие меньшего пятна синевато-фиолетового цвета.

Глутаминовая кислота. [56-86-0]. $C_5H_9NO_4$. (М.м. 147,13).

(2*S*)-2-Аминопентандиовая кислота.

Содержит от 98,5 до 100,5 % $C_5H_9NO_4$ в пересчете на сухое вещество.

Белый кристаллический порошок или бесцветные кристаллы.

Легко растворима в кипящей воде, мало растворима в холодной воде; практически нерастворима в спирте 96 %, эфире и ацетоне.

Глутаровый альдегид. [111-30-8]. $C_5H_8O_2$. (М.м. 100,12).

Пентандиаль.

Маслянистая жидкость. Растворим в воде.

n_D^{25}. Около 1,434.

Температура кипения. Около 188 °C.

Глюкоза безводная. [50-99-7]. $C_6H_{12}O_6$. (М.м. 180,16). D-глюкопираноза.

Белый кристаллический порошок сладкого вкуса.

Легко растворима в воде, умеренно растворима в спирте 96 %.

Глюкоза. [14431-43-7]. $C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$. (М.м. 198,17).

D-Глюкопираноза, моногидрат.

Белый кристаллический порошок со сладким вкусом.

Легко растворима в воде, умеренно растворима в спирте 96 %.

Глюкозамина гидрохлорид. [66-84-2]. $C_6H_{13}NO_5 \cdot HCl$. (М.м. 215,63).

2-Амино-2-дезокси-β-D-глюкопиранозы гидрохлорид.

Кристаллы.

Растворим в воде, практически нерастворим в эфире.

$[\alpha]_D^{20}$. + 100°, снижающееся до + 47,5° через 30 мин (10 % раствор).

D-Глюкуроновая кислота. [6556-12-3]. $C_6H_{10}O_7$. (М.м. 194,14).

D-Глюкопирануроновая кислота.

Содержит не менее 96,0 % $C_6H_{10}O_7$ в пересчете на сухое вещество, высушенное в вакууме.

Растворима в воде и спирте 96 %.

Обнаруживает мутаротацию $[\alpha]_D^{20}$: + 11,7° → + 36,3°.

Количественное определение. 0,150 г D-глюкуроновой кислоты растворяют при перемешивании в метаноле безводном и титруют 0,1 М раствором тетрабутиламмония гидроксида потенциометрически, защищая раствор от воздействия углерода диоксида воздуха во время растворения и титрования.

1 мл 0,1 М раствора тетрабутиламмония гидроксида соответствует 19,41 мг $C_6H_{10}O_7$.

Гольмия(III) оксид. [12055-62-8]. Ho_2O_3. (М.м. 377,86). Оксид гольмия(III).

Порошок желтоватого цвета.

Практически нерастворим в воде.

Гольмия перхлората раствор 4 %. Раствор 40 г/л гольмия(III) оксида в 14,1 % растворе хлорной кислоты.

Грисса-Илосвая реактив.

Раствор 1. 1,66 г сульфаниловой кислоты растворяют в 425 мл воды и прибавляют 75 мл уксусной кислоты. Срок годности раствора – 2 мес.

Раствор 2. 0,3 г нафтиламина растворяют в 60 мл воды, кипятят 3 мин, прозрачный раствор сливают и смешивают с 450 мл 15 % уксусной кислоты разведённой. Раствор готовят и хранят в тёмных склянках. Раствор годен до появления розовой окраски.

Растворы 1 и 2 смешивают 1:1 непосредственно перед использованием.

Гуанидина гидрохлорид. [50-01-1]. $CH_5N_3 \cdot HCl$. (М.м. 95,53).

Гидрохлорид гуанидина.

Кристаллический порошок.

Легко растворим в воде и спирте 96 %.

Гуанин. [73-40-5]. $C_5H_5N_5O$. (М.м. 151,13). 2-Амино-1,7-дигидро-6*H*-пурин-6-он.

Аморфный порошок белого цвета.

Практически нерастворим в воде, мало растворим в спирте 96 %, растворим в растворах аммиака и разведённых растворах гидроксидов щелочных металлов.

Гуанозин. [118-00-3]. $C_{10}H_{13}N_5O_5$. (М.м. 283,24).

9-(β-D-Рибофуранозил)-1,9-дигидро-6*H*-пурин-6-он.

Содержит не менее 98 % $C_{10}H_{13}N_5O_5$.

Температура плавления. Около 250° (с разл.).

Гуммиарабик.

Смола, полученная из ствола и ветвей *Acacia senegal* L. Willd (синоним *Senegalia senegal* (L.) Britton), других видов *Acacia* африканского происхождения и *Acacia seyal* Delile.

Твердые фрагменты жёлто-оранжевого или оранжево-коричневого цвета. Легко растворим в воде.

Гуммиарабика раствор 10 %.

20,0 г гуммиарабика смешивают с 200 мл воды, перемешивают в течение 2 ч. Центрифугируют полученную смесь при 2000 об/мин в течение 30 мин, фильтруют через бумажный фильтр. Раствор хранят в пластиковых ёмкостях при температуре не выше 15 °С не более 3 суток.

Дантрон. [117-10-2]. $C_{14}H_8O_4$. (М.м. 240,21).

1,8-Дигидроксиантрацен-9,10-дион.

Кристаллический порошок оранжевого цвета.

Мало растворим в воде, растворим в этаноле, хлороформе и эфире.

Температура плавления. Около 195 °С.

Смесь ***о,п*-ДДД** и ***п,п*-ДДД**.

***о,п*-ДДД**. [53-19-0]. (М.м. 320,04).

1-[2,2-Дихлор-1-(4-хлорфенил)этил]-2-хлорбензол.

***п,п*-ДДД**. [72-54-8]. (М.м. 320,04).

1-[2,2-Дихлор-1-(4-хлорфенил)этил]-4-хлорбензол.

Температура кипения. 193 °С.

Температура плавления. 109 °С.

ДДТ. Смесь ***o,n*-ДДТ** и ***n,n*-ДДТ**.

***o,n*-ДДТ**. [789-02-6]. ***o,n*-ДДТ**. [789-02-6]. (М.м. 354,49).

1-[2,2.2-Трихлор-1-(4-хлорфенил)этил]-2-хлорбензол.

***n,n*-ДДТ**. [50-29-3]. (М.м. 354,49).

1-[2,2.2-Трихлор-1-(4-хлорфенил)этил]-4-хлорбензол.

Температура кипения. 260 °С.

Температура плавления. От 108 до 109 °С.

Дейтерия оксид. [7789-20-0]. D_2O. (М.м. 20,03). Вода-d_2.

Степень дейтерирования не менее 99,7 %.

d_{20}^{20}. Около 1,11.

n_D^{20}. Около 1,328.

Температура кипения. Около 101 °С.

Дейтерированная уксусная кислота. [1186-52-3]. $C_2D_4O_2$. (М.м. 64,08).

Уксусная кислота-d_4.

Степень дейтерирования не менее 99,7 %.

Прозрачная, бесцветная жидкость.

Легко смешивается с водой, спиртом 96 % и эфиром.

d_{20}^{20}. Около 1,12.

n_D^{20}. Около 1,368.

Температура кипения. Около 115 °С.

Температура плавления. Около 16 °С.

Дейтерированный ацетон. [666-52-4]. C_3D_6O. (М.м. 64,12). Ацетон-d_6.

Степень дейтерирования не менее 99,5 %.

Прозрачная, бесцветная жидкость.

Смешивается с водой, диметилформамидом, этанолом, эфиром и метанолом.

d_{20}^{20}. Около 0,87.

n_D^{20}. Около 1,357.

Температура кипения. Около 55 °С.

Вода и дейтерия оксид. Не более 0,1 %.

Дейтерированный диметилсульфоксид. [2206-27-1]. C_2D_6OS. (М.м. 84,17).

Сульфинилдиметан-d_6..

Степень дейтерирования не менее 99,8 %.

Вязкая, практически бесцветная, сильно гигроскопичная жидкость.

Растворим в воде, ацетоне, этаноле и эфире.

d_{20}^{20}. Около 1,18.

Температура плавления. Около 20 °С.

Вода и дейтерия оксид. Не более 0,1 %.

Хранят в воздухонепроницаемой упаковке.

Дейтерированный метанол. [811-98-3]. CD_4O. (М.м. 36,07). Метанол-d_4.

Степень дейтерирования не менее 99,8 %.

Прозрачная, бесцветная жидкость.

Смешивается с водой, спиртом 96 % и метиленхлоридом.

d_{20}^{20}. Около 0,888.

n_D^{20}. Около 1,326.

Температура кипения. 65,4 °С.

Дейтерированный хлороформ. [865-49-6]. $CDCl_3$. (М.м. 120,38).

Трихлорметан-*d*.

Степень дейтерирования не менее 99,7 %.

Прозрачная, бесцветная жидкость.

Практически нерастворим в воде, смешивается с ацетоном, спиртом 96 % и эфиром.

Может быть стабилизирован серебряной фольгой.

d_{20}^{20}. Около 1,51.

n_D^{20}. Около 1,445.

Температура кипения. Около 60 °С.

Вода и дейтерия оксид. Не более 0,05 %.

Декан. [124-18-5]. $C_{10}H_{22}$. (М.м. 142,28).

Декан.

Бесцветная жидкость. Практически нерастворим в воде.

n_D^{20}. Около 1,411.

Температура кипения. Около 174 °С.

Деканол. [112-30-1]. $C_{10}H_{22}O$. (М.м. 158,28).

Декан-1-ол.

Вязкая жидкость, затвердевающая при температуре 6 °С.

Практически нерастворим в воде, растворим в спирте 96 % и эфире.

n_D^{20}. Около 1,436.

Температура кипения. Около 230 °С.

Дексаметазон–альдегид. [6762-51-2]. $C_{22}H_{27}FO_4$. (М.м. 374,45).

11β,20-Дигидрокси-16α-метил-3-оксо-9-фторпрегна-1,4,17(20)-триен-21-аль.

Содержит не менее 95 % $C_{22}H_{27}FO_4$.

Температура плавления. От 226 до 230 °С (с разл.).

Дексаметазон–кетон. [1880-61-1]. $C_{20}H_{25}FO_3$. (М.м. 332,41).

11β-Гидрокси-16α-метил-9-фторандроста-1,4-диен-3,17-дион.

Содержит не менее 95 % $C_{20}H_{25}FO_3$.

Температура плавления. От 242 до 244 °С.

Дексаметазон-кислота. [37927-01-8]. $C_{21}H_{27}FO_5$. (М.м. 378,43).

11β,17-Дигидрокси-16α-метил-3-оксо-9-фторандроста-1,4-диен-17β-карбоновая кислота.

Содержит не менее 95 % $C_{21}H_{27}FO_5$.

Температура плавления. От 277 до 280 °С.

Декстран 2000 синий. [9049-32-5].

Готовят из декстрана, имеющего среднюю молекулярную массу $2 \cdot 10^6$, введением полициклического хромофора, окрашивающего вещество в синий цвет. Степень замещения 0,017. Высушивают при замораживании.

Быстро и полностью растворяется в воде и водных солевых растворах.

0,1 % раствор в фосфатном буферном растворе pH 7 имеет максимум поглощения при длине волне 280 нм.

Декстран поперечно-сшитый для хроматографии (1).

Гранулы шарообразной формы, пригодны для разделения пептидов и белков с молекулярными массами от $15 \cdot 10^2$ до $30 \cdot 10^3$. Сухие гранулы имеют диаметр от 20 до 80 мкм.

Декстран поперечно-сшитый для хроматографии (3).

Гранулы шарообразной формы пригодны для разделения пептидов и белков с молекулярными массами от $4 \cdot 10^3$ до $15 \cdot 10^4$. Сухие гранулы имеют диаметр от 40 до 120 мкм.

Декстроза. См. **Глюкоза**.

Дельтаметрин. [52918-63-5]. $C_{22}H_{19}Br_2NO_3$. (М.м. 505,2).

(*S*)-(3-Феноксифенил)(циано)метил[(1*R*,3*R*)-3-(2,2-дибромэтенил)-2,2-диметилциклопропанкарбоксилат].

Температура кипения. 300 °С.

Температура плавления. 98 °С.

2'-Деоксиуридин. [951-78-0]. $C_9H_{12}N_2O_5$. (М.м. 228,20).

1-(2-Дезокси-β-D-рибофуранозил)пиримидин-2,4(1*H*,3*H*)-дион.

Температура плавления. Около 165 °С.

Диазореактив.

5 мл раствора сульфаниловой кислоты (4,5 г сульфаниловой кислоты и 45 мл хлористоводородной кислоты концентрированной в 500 мл воды) вносят в колбу, поставленную на лед, прибавляют 2,5 мл 10 % раствора натрия нитрита. Смесь оставляют на льду в течение 5 мин, затем прибавляют еще 10 мл 10 % раствора натрия нитрита, взбалтывают, оставляют на льду в течение 5 мин и доводят объём раствора водой до 100 мл.

Хранят на льду. Используют свежеприготовленным, сохраняя на льду.

Диазотированный сульфацил. 7 г сульфацил-натрия растворяют в 50 мл воды, прибавляют 9 мл хлористоводородной кислоты концентрированной и доводят объём раствора водой до 100 мл. 1 мл полученного раствора помещают в колбу, поставленную на лед, прибавляют 50 мл воды, 0,2 мл

10 % раствора натрия нитрита, перемешивают и доводят объём раствора водой до 100 мл. Используют свежеприготовленным.

3,3'-Диаминобензидина тетрагидрохлорид. [7411-49-6].

$C_{12}H_{14}N_4 \cdot 4HCl \cdot 2H_2O$. (М.м. 396,14).

[1,1'-Бифенил]-3,3',4,4'-тетрамина тетрагидрохлорид дигидрат.

Порошок почти белого или слегка розового цвета.

Растворим в воде.

Температура плавления. Около 280 °С с разложением.

Диатомит. [91053-39-3].

Мелкий гранулированный порошок белого или почти белого цвета, полученный из кремнистых оболочек окаменевших диатомовых водорослей или их осколков.

Практически нерастворим в воде, спирте 96 % и эфире.

Идентифицируют с помощью микроскопа при увеличении 500×.

Диатомит для газовой хроматографии.

Мелкий гранулированный порошок белого или почти белого цвета, полученный из кремнистых оболочек окаменевших диатомовых водорослей или их осколков.

Практически нерастворим в воде, спирте 96 % и эфире.

Идентифицируют с помощью микроскопа при увеличении 500×; очищают обработкой хлористоводородной кислотой концентрированной и промыванием водой.

Размер частиц. Не более 5 % должно оставаться на сите № 180 и не более 10 % должно проходить через сито № 125.

Диатомит для газовой хроматографии (1).

Мелкий гранулированный порошок белого или почти белого цвета, полученный из кремнистых оболочек окаменевших диатомовых водорослей или их осколков.

Практически нерастворим в воде, спирте 96 % и эфире.

Идентифицируют с помощью микроскопа при увеличении 500×; очищают обработкой хлористоводородной кислотой концентрированной и промыванием водой.

Размер частиц. Не более 5 % должно оставаться на сите № 250 и не более 10 % должно проходить через сито № 180.

Диатомит для газовой хроматографии (2).

Мелкий гранулированный порошок белого или почти белого цвета с удельной площадью поверхности около 0,5 $м^2$/г, полученный из кремнистых оболочек окаменевших диатомовых водорослей или их осколков.

Практически нерастворим в воде, спирте 96 % и эфире.

Идентифицируют с помощью микроскопа при увеличении 500×; очищают обработкой хлористоводородной кислотой концентрированной и промыванием водой.

Размер частиц. Не более 5 % должно оставаться на сите № 180. Не более 10 % должно проходить через сито № 125.

Диатомит силанизированный для газовой хроматографии.

Диатомит для газовой хроматографии, силанизированный диметилдихлорсиланом или другими подходящими силанизирующими реагентами.

Диатомит силанизированный для газовой хроматографии (1).

Получают из измельченного красного огнеупорного кирпича и силанизируют диметилдихлорсиланом или другими подходящими силанизирующими реагентами. Очищают обработкой хлористоводородной кислотой концентрированной и промыванием водой.

Дибензил. [103-29-7]. $C_{14}H_{14}$. (М.м. 182,26).

1,1'-Этан-1,2-диилдибензол. Кристаллический порошок белого цвета.

Практически нерастворим в воде, очень легко растворим в метиленхлориде, легко растворим в ацетоне, растворим в спирте 96 %.

Температура плавления. От 50 до 53 °С.

Дибутиламин. [111-92-2]. $C_8H_{19}N$. (М.м. 129,24).

N-Бутилбутан-1-амин.

Бесцветная жидкость.

n_D^{20}. Около 1,417.

Температура кипения. 159,6 °C.

Дибутиловый эфир. [142-96-1]. $C_8H_{18}O$. (М.м. 130,23).

1,1'-Оксидибутан.

Бесцветная, воспламеняющаяся жидкость.

Практически нерастворим в воде, смешивается с этанолом и эфиром.

d_{20}^{20}. Около 0,77.

n_D^{20}. Около 1,399.

Не перегоняют, если дибутиловый эфир не выдерживает испытания на пероксиды.

Пероксиды. 8 мл раствора крахмала с калия йодидом помещают в цилиндр с притертой стеклянной пробкой, вместимостью 12 мл и диаметром около 1,5 см, полностью заполняют испытуемым эфиром, закрывают пробкой и перемешивают. Выдерживают в темном месте в течение 30 мин; не должно появляться окрашивание.

Название и концентрация любого добавленного стабилизатора должны быть указаны на этикетке.

Дибутилфталат. [84-74-2]. $C_{16}H_{22}O_4$. (М.м. 278,34).

Дибутил(бензол-1,2-дикарбоксилат).

Прозрачная, бесцветная или слабоокрашенная маслянистая жидкость.

Очень мало растворим в воде, смешивается с ацетоном, спиртом 96 % и эфиром.

d_{20}^{20}. От 1,043 до 1,048.

n_D^{20}. От 1,490 до 1,495.

2,5-Дигидроксибензойная кислота. [490-79-9]. $C_7H_6O_4$. (М.м. 154,12).

2,5-Дигидроксибензойная кислота.

Светло-желтые кристаллы.

Температура плавления. Около 205 °С.

10,11-Дигидрокарбамазепин. [3564-73-6]. $C_{15}H_{14}N_2O$. (М.м. 238,28).

10,11-Дигидро-5*H*-дибензо[*b*,*f*]азепин-5-карбоксамид.

Температура плавления. От 205 до 210 °С.

1,3-Дигидроксинафталин. [132-86-5]. $C_{10}H_8O_2$. (М.м. 160,17).

Нафталин-1,3-диол.

Кристаллический порошок коричневато-фиолетового цвета.

Легко растворим в воде и спирте 96 %.

Температура плавления. Около 125 °С.

1,3-Дигидроксинафталина раствор 0,2 %. 0,2 г 1,3-дигидроксинафталина с содержанием основного вещества не менее 98 % помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в спирте 96 % и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

2,7-Дигидроксинафталин. [582-17-2]. $C_{10}H_8O_2$. (М.м. 160,17).

Нафталин-2,7-диол.

Игольчатые кристаллы.

Растворим в воде, спирте 96 % и эфире.

Температура плавления. Около 190 °С.

2,7-Дигидроксинафталина раствор.

10 мг 2,7-дигидроксинафталина растворяют в 100 мл серной кислоты концентрированной и выдерживают до обесцвечивания.

Срок годности 2 сут.

Дигитонин. [11024-24-1]. $C_{56}H_{92}O_{29}$. (М.м. 1229). 3β-[β-D-Глюкопиранозил-(1→3)-β-D-галактопиранозил-(1→2)-[β-D-ксилопиранозил-(1→3)]-β-D-галактопиранозил-(1→4)-β-D-галактопиранозилокси]-(25*R*)-5α-спиростан-2α,15β-диол.

Кристаллы или кристаллический порошок белого цвета.

Практически нерастворим в воде, умеренно растворим в этаноле, мало растворим в спирте 96 %, практически нерастворим в эфире.

Дидодецил-3,3′-тиодипропионат. [123-28-4]. $C_{30}H_{58}O_4S$. (М.м. 514,8).

Дидодецил(3,3'-сульфандиилдипропаноат).

Кристаллический порошок белого цвета.

Практически нерастворим в воде, легко растворим в ацетоне и петролейном эфире, мало растворим в спирте 96 %.

Температура плавления. Около 39 °С.

Диизобутилкетон. [108-83-8]. $C_9H_{18}O$. (М.м. 141,24).

2,6-Диметилгептан-4-он.

Прозрачная, бесцветная жидкость.

Мало растворим в воде, смешивается с большинством органических растворителей.

n_D^{20}. Около 1,414.

Температура кипения. Около 168 °С.

Диизопропиловый эфир. [108-20-3]. $C_6H_{14}O$. (М.м. 102,17).

2,2'-Оксидипропан.

Прозрачная, бесцветная жидкость.

Очень мало растворим в воде, смешивается со спиртом 96 % и эфиром.

d_{20}^{20}. От 0,723 до 0,728.

Температура кипения. От 67 до 69 °С.

Не перегоняют, если диизопропиловый эфир не выдерживает испытания на пероксиды.

Пероксиды. 8 мл раствора крахмала с калия йодидом помещают в цилиндр с притертой стеклянной пробкой вместимостью 12 мл и диаметром около 1,5 см, полностью заполняют испытуемым эфиром, закрывают пробкой и перемешивают. Выдерживают в темном месте в течение 30 мин. Не должно появляться окрашивание.

Название и концентрация любого добавленного стабилизатора должны быть указаны на этикетке.

Хранят в защищенном от света месте.

Диизопропилэтиламин. [7087-68-5]. $C_8H_{19}N$. (М.м. 129,24).

N-(Пропан-2-ил)-*N*-этилпропан-2-амин.

Содержит не менее 98 % $C_8H_{19}N$.

Бесцветная или светло-желтая прозрачная жидкость с характерным запахом аминов.

d_{20}^{20}. Около 0,472.

n_D^{20}. Около 1,413.

Температура кипения. Около 127 °С.

Дикалия гидрофосфат. [7758-11-4]. K_2HPO_4. (М.м. 174,18).

Гидрофосфат дикалия.

Кристаллический порошок белого цвета, гигроскопичен.

Очень легко растворим в воде, мало растворим в спирте 96 %.

Хранят в воздухонепроницаемой упаковке.

Дикалия гидрофосфат тригидрат. [16788-57-1]. $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$.
(М.м. 228,22).

Гидрофосфат дикалия, тригидрат.

Белый кристаллический порошок или кристаллы.

Дикарбоксидина гидрохлорид. [56455-90-4]. $C_{20}H_{24}N_2O_6 \cdot HCl$. (М.м. 461,3).

4,4′-[4,4′-Диамино[1,1′-бифенил]-3,3′-диилбис(окси)]дибутановой кислоты дигидрохлорид.

Диметикон. [9016-00-6].

Представляет собой поли(диметил)силоксан, получаемый при гидролизе и поликонденсации дихлордиметилсилана и хлортриметилсилана; степень полимеризации (n = 20–400) обеспечивает кинематическую вязкость от 20 $мм^2 \cdot с^{-1}$ до 1300 $мм^2 \cdot с^{-1}$.

Прозрачная бесцветная жидкость с различной вязкостью.

Практически нерастворим в воде, очень мало растворим до практически нерастворим в этаноле; смешивается с этилацетатом, метилэтилкетоном, толуолом.

Диметиламин. [124-40-3]. C_2H_7N. (М.м. 45,08).

N-Метилметанамин.

Бесцветный огнеопасный газ.

Температура кипения. 7 °С.

Температура плавления. – 92,2 °С.

Диметиламинобензальдегид. [100-10-7]. $C_9H_{11}NO$. (М.м. 149,19).

4-(Диметиламино)бензальдегид.

Кристаллы белого или желтовато-белого цвета.

Растворим в спирте 96 % и разведённых растворах неорганических кислот.

Температура плавления. Около 74 °С.

Диметиламинобензальдегида кислотно-спиртовой раствор 1 %.

В 1,0 мл хлористоводородной кислоты концентрированной растворяют 0,1 г диметиламинобензальдегида и доводят объём раствора спиртом 96 % до 100,0 мл.

Диметиламинобензальдегида спиртовой раствор.

0,2 г диметиламинобензальдегида растворяют в 20 мл спирта 96 %, прибавляют 0,5 мл 25 % хлористоводородной кислоты, полученный раствор встряхивают с углем активированным и фильтруют. Окраска раствора не должна быть интенсивнее окраски 0,00025 М раствора йода.

Готовят непосредственно перед использованием.

Диметиламинобензальдегида раствор 2 %.

0,2 г диметиламинобензальдегида растворяют без нагревания в смеси 4,5 мл воды и 5,5 мл хлористоводородной кислоты концентрированной.

Готовят непосредственно перед использованием.

Диметиламинобензальдегида раствор 1 % в метаноле.

0,1 г диметиламинобензальдегида растворяют в 10 мл метанола.

Раствор используют свежеприготовленным.

Диметиламинобензальдегида раствор 1 % в спирте 96 %.

0,1 г диметиламинобензальдегида растворяют в 10 мл спирта 96 %.

Раствор используют свежеприготовленным.

Диметиламинобензальдегида раствор 1 % в 1 М растворе хлористоводородной кислоты.

0,1 г диметиламинобензальдегида растворяют в 10 мл 1 М раствора хлористоводородной кислоты.

Раствор используют свежеприготовленным.

Диметиламинобензальдегида раствор в серной кислоте концентрированной 1 %.

0,1 г диметиламинобензальдегида растворяют в 10 мл серной кислоты концентрированной.

Раствор используют свежеприготовленным.

Диметиламинобензальдегида раствор (реактив Олпорта).

0,125 г диметиламинобензальдегида растворяют в охлажденной смеси 35 мл воды и 65 мл серной кислоты концентрированной, прибавляют 0,1 мл 5 % раствора железа(III) хлорида.

Перед использованием выдерживают 24 ч в защищенном от света месте.

Хранят при комнатной температуре в течение 7 сут; в холодильнике – в течение нескольких месяцев.

Диметиламинобензальдегида спиртовой раствор в хлористоводородной кислоте.

1,0 г диметиламинобензальдегида растворяют в 50 мл хлористоводородной кислоты концентрированной и прибавляют 50 мл спирта 96 %.

Хранят в защищенном от света месте. Срок годности 1 мес.

Диметиламинобензальдегида раствор в смеси фосфорной и уксусной кислот.

0,25 г диметиламинобензальдегида растворяют в смеси 5 г 85 % фосфорной кислоты, 45 г воды и 50 г уксусной кислоты безводной.

Готовят непосредственно перед использованием.

Диметиламинобензальдегида раствор в концентрированной серной кислоте.

1 г диметиламинобензальдегида смачивают 4 каплями воды и прибавляют 3 мл серной кислоты концентрированной.

Диметиламинобензальдегида раствор 10 % в концентрированной серной кислоте.

0,1 г диметиламинобензальдегида растворяют в 10 мл серной кислоты концентрированной.

Раствор используют свежеприготовленным.

4-Диметиламинокоричный альдегид. [6203-18-5]. $C_{11}H_{13}NO$. (М.м. 175,23).

3-[(4-Диметиламино)фенил]проп-2-еналь.

Кристаллы или порошок от оранжевого до оранжево-коричневого цвета. Чувствителен к свету.

Очень мало растворим в воде, мало растворим в этаноле и эфире.

Температура плавления. Около 138 °С.

4-Диметиламинокоричного альдегида раствор.

2 г 4-диметиламинокоричного альдегида растворяют в смеси 100 мл 25 % хлористоводородной кислоты и 100 мл этанола. Хранят в прохладном месте.

Непосредственно перед использованием раствор разводят этанолом в 4 раза. Хранят в прохладном месте.

Диметиламинонафталинсульфонилхлорид. [605-65-2]. $C_{12}H_{12}ClNO_2S$. (М.м. 269,75).

5-(Диметиламино)нафталин-1-сульфонилхлорид.

Кристаллический порошок желтого цвета.

Мало растворим в воде, растворим в метаноле.

Температура плавления. Около 70 °С.

Хранят в прохладном месте.

Диметиламиноэтилбензилат. [968-46-7]. $C_{18}H_{21}NO_3$. (М.м. 299,36).

[2-(Диметиламино)этил][гидрокси(дифенил)ацетат].

Содержит не менее 96 % $C_{18}H_{21}NO_3$.

d_{20}^{20}. Около 1,149.

n_D^{20}. Около 1,534.

Диметиланилин. [121-69-7]. $C_8H_{11}N$. (М.м. 121,18).

N,*N*-Диметиланилин.

Прозрачная, маслянистая жидкость. Свежеперегнанный – почти бесцветный, при хранении темнеет до красновато-коричневого цвета.

Практически нерастворим в воде, легко растворим в спирте 96 % и эфире.

n_D^{20}. Около 1,558.

Температурные пределы перегонки. От 192 до 194 °С; должно перегоняться не менее 95 %.

2,3-Диметиланилин. [87-59-2]. $C_8H_{11}N$. (М.м. 121,18).

2,3-Диметиланилин.

Жидкость желтоватого цвета.

Умеренно растворим в воде, растворим в спирте 96 %.

d_{20}^{20}. От 0,993 до 0,995.

n_D^{20}. Около 1,569.

Температура кипения. Около 224 °С.

2,6-Диметиланилин. [87-62-7]. $C_8H_{11}N$. (М.м. 121,18).

2,6-Диметиланилин.

Бесцветная жидкость.

Умеренно растворим в воде, растворим в спирте 96 %.

d_{20}^{20}. Около 0,98.

Диметилацетамид. [127-19-5]. C_4H_9NO. (М.м. 87,12). *N*,*N*-Диметилацетамид.

Содержит не менее 99,5 % C_4H_9NO.

Бесцветная жидкость.

Смешивается с водой и большинством органических растворителей.

d_{20}^{20}. Около 0,94.

n_D^{20}. Около 1,437.

Температура кипения. Около 165 °С.

Диметилглиоксим. [95-45-4]. $C_4H_8N_2O_2$. (М.м. 116,12).

Бутан-2,3-диилиденбис(гидроксиламин).

Кристаллический порошок белого цвета или бесцветные кристаллы.

Практически нерастворим в холодной воде, очень мало растворим в кипящей воде, растворим в спирте 96 % и эфире.

Температура плавления. Около 240 °С с разложением.

Сульфатная зола. Не более 0,05 %.

Диметилглиоксима раствор.

1 г диметилглиоксима растворяют в 100 мл 5 % раствора натрия гидроксида.

Диметилдециламин. [1120-24-7]. $C_{12}H_{27}N$. (М.м. 185,35).

N,*N*-Диметилдекан-1-амин.

Содержит не менее 98,0 % (м/м) $C_{12}H_{27}N$.

Температура кипения. Около 234 °С.

Диметилкарбонат. [616-38-6]. $C_3H_6O_3$ (М.м. 90,08). Диметилкарбонат.

Бесцветная жидкость.

Практически нерастворим в воде, смешивается со спиртом 96 %.

d_4^{17}. Около 1,065.

n_D^{20}. Около 1,368.

Температура кипения. Около 90 °С.

Диметиловый желтый. [60-11-7]. $C_{14}H_{15}N_3$. (М.м. 225,29).

N,*N*-Диметил-4-(фенилдиазенил)анилин.

Мелкие кристаллы желтого цвета или хлопья желтого или оранжевого цвета.

Практически нерастворим в воде, очень мало растворим в спирте 96 %.

Хроматография. Определение проводят методом тонкослойной хроматографии, используя в качестве тонкого слоя силикагель G. На хроматографическую пластинку наносят 10 мкл 0,01 % раствора диметилового желтого в метиленхлориде и хроматографируют в этом же растворителе, фронт растворителя должен пройти не менее 10 см; на хроматограмме должно обнаруживаться только одно основное пятно.

Хранят в воздухонепроницаемой упаковке.

Диметилового желтого и орацетового синего раствор.

10 мг диметилового желтого и 10 мг орацетового синего В растворяют в 300 мл метиленхлорида.

Диметилового желтого раствор.

1. 0,1 % раствор в спирте 96 %.

2. 0,1 % раствор в бензоле.

Переход окраски раствора от красной к желтой в интервале pH 3,0 – 4,0.

***N*,*N*-Диметилоктиламин**. [7378-99-6]. $C_{10}H_{23}N$. (М.м. 157,30).

N,*N*-Диметилоктан-1-амин.

Бесцветная жидкость.

Очень мало растворим в воде, растворим в этаноле и эфире.

d_{20}^{20}. Около 0,765.

n_D^{20}. Около 1,424.

Температура кипения. Около 195 °С.

1,3-Диметил-2-имидазолидинон. [80-73-9]. $C_5H_{10}N_2O$. (М.м. 114,15).

1,3-Диметилимидазолидин-2-он.

n_D^{20}. Около 1,4720.

Температура кипения. Около 224 °С.

Диметилпиперазин. [106-58-1]. $C_6H_{14}N_2$. (М.м. 114,19).

1,4-Диметилпиперазин.

Бесцветная жидкость. Смешивается с водой и спиртом 96 %.

d_{20}^{20}. Около 0,85.

n_D^{20}. Около 1,446.

Температура кипения. Около 131 °С.

Диметилстеарамид. [3886-90-6]. $C_{20}H_{41}NO$. (М.м. 311,55).

N,*N*-Диметилоктадеканамид.

Твердая масса белого или почти белого цвета.

Растворим в большинстве органических растворителей, включая ацетон.

Температура плавления. Около 51 °С.

Диметилсульфоксид. [67-68-5]. C_2H_6OS. (М.м. 78,13).

Сульфинилдиметан.

Прозрачная, бесцветная, маслянистая, гигроскопичная жидкость.

Смешивается с водой и спиртом 96 %.

d_{20}^{20}. Около 1,10.

Температура кипения. Около 189 °С.

Вода. Не более 10 г/л.

Диметилсульфоксид, используемый в спектрофотометрии, должен выдерживать требования для диметилсульфоксида, но с другим содержанием воды, приведенным ниже, и, кроме того, должен выдерживать следующие дополнительные испытания.

Минимальное пропускание. 10 % при длине волны 262 нм; 35 % при длине волны 270 нм; 70 % при длине волны 290 нм; 98 % при длине волны 340 нм и более.

Определение проводят, используя в качестве раствора сравнения воду.

Вода. Не более 0,2 % (м/м).

Хранят в воздухонепроницаемой упаковке.

Диметилсульфон. [67-71-0]. $C_2H_6O_2S$. (М.м. 94,13). Сульфонилдиметан.

Кристаллический порошок белого цвета.

Легко растворим в воде, растворим в ацетоне и спирте 96 %.

Температура плавления. От 108 до 110 °С.

Диметилтетрадециламин. [112-75-4]. $C_{16}H_{35}N$. ((М.м. 241,46). *N*,*N*-Диметилтетрадекан-1-амин.

Содержит не менее 98,0 % (м/м) и не более 101,0 % (м/м) $C_{16}H_{35}N$.

Прозрачная или почти прозрачная, бесцветная или желтоватого цвета жидкость.

Практически нерастворим в воде, смешивается с ацетоном, спиртом 96 % и метанолом.

d_{20}^{20}. Около 0,80.

Температура кипения. Около 260 °С.

Вода. Не более 0,3 % (м/м).

Количественное определение. 0,200 г растворяют в 10 мл спирта 96 % и титруют 0,1 М раствором хлористоводородной кислоты до красного

окрашивания, используя в качестве индикатора 0,1 мл 0,05 % раствора метилового красного.

1 мл 0,1 М раствора хлористоводородной кислоты соответствует 24,15 мг $C_{16}H_{35}N$.

***N,N*-Диметил-L-фенилаланин**. [17469-89-5]. $C_{11}H_{15}NO_2$. (М.м. 193,24).

(2*S*)-2-Амино-3-фенилпропановая кислота.

Содержит не менее 99 % $C_{11}H_{15}NO_2$.

Температура плавления. Около 226 °С.

Диметилфенилендиамина сульфат. [536-47-0]. $C_8H_{12}N_2 \cdot H_2SO_4$. (М.м. 234,27).

N,N′-Диметилбензол-1,4-диамина сульфат (1:1).

Содержит не менее 98 % $C_8H_{12}N_2 \cdot H_2SO_4$.

Порошок белого или слегка желтоватого цвета. Растворим в воде.

Температура плавления. Около 200 °С, с разложением.

Хранят в защищенном от света месте.

2,6-Диметилфенол. [576-26-1]. $C_8H_{10}O$. (М.м. 122,16). 2,6-Диметилфенол.

Бесцветные игольчатые кристаллы.

Мало растворим в воде, легко растворим в спирте 96 % и эфире.

Температура кипения. Около 203 °С.

Температура плавления. От 46 до 48 °С.

3,4-Диметилфенол. [95-65-8]. $C_8H_{10}O$. (М.м. 122,16). 3,4-Диметилфенол.

Кристаллы белого или почти белого цвета.

Мало растворим в воде, легко растворим в спирте 96 %.

Температура кипения. Около 226 °С.

Температура плавления. От 25 до 27 °С.

Диметилформамид. [68-12-2]. C_3H_7NO. (М.м. 73,09).

N,N-Диметилформамид.

Прозрачная, бесцветная, жидкость.

Смешивается с водой и спиртом 96 %.

d_{20}^{20}. От 0,949 до 0,952.

Температура кипения. Около 153 °C.

Вода. Не более 0,1 %.

Диметилформамида диметилацеталь. [4637-24-5]. $C_5H_{13}NO_2$. (М.м. 119,16).

N,*N*-Диметил-1,1-диметоксиметанамин.

d_4^{20}. Около 0,896.

n_D^{20}. Около 1,396.

Температура кипения. Около 103 °C.

Диметилформамида диэтилацеталь. [1188-33-6]. $C_7H_{17}NO_2$. (М.м. 147,22).

N,*N*-Диметил-1,1-диэтоксиметанамин.

n_D^{20}. Около 1,40.

Температура кипения. От 128 до 130 °C.

1,1-Диметилэтиламин. [75-64-9]. $C_4H_{11}N$. (М.м. 73,14).

2-Метилпропан-2-амин.

Жидкость.

Смешивается со спиртом 96 %.

d_{20}^{20}. Около 0,694.

n_D^{20}. Около 1,378.

Температура кипения. Около 46 °C.

1,1-Диметилэтилметиловый эфир. [1634-04-4]. $C_5H_{12}O$. (М.м. 88,15).

2-Метил-2-метоксипропан.

Бесцветная, прозрачная, воспламеняющаяся жидкость.

Очень мало растворим в воде, смешивается с этанолом и эфиром.

n_D^{20}. Около 1,376.

Минимальное пропускание. Не менее 50 % при длине волны 240 нм; не менее 80 % при длине волны 255 нм; не менее 98 % при длине волны 280 нм.

Определение проводят, используя в качестве раствора сравнения воду.

Диметоксипропан. [77-76-9]. $C_5H_{12}O_2$. (М.м. 104,15). 2,2-Диметоксипропан.

Бесцветная жидкость. Разлагается под действием влажного воздуха или воды.

Растворим в этаноле и эфире.

d_{20}^{20}. Около 0,847.

n_D^{20}. Около 1,378.

Температура кипения. Около 83 °С.

Димидия бромид. [518-67-2]. $C_{20}H_{18}BrN_3$. (М.м. 380,28).

3,8-Диамино-5-метил-6-фенилфенантридин-5-ий бромид.

Кристаллы темно-красного цвета.

Мало растворим в воде при температуре 20 °С, умеренно растворим в воде при температуре 60 °С и спирте 96 %, практически нерастворим в эфире.

Димидия бромида и сульфанового синего смешанный раствор.

Отдельно растворяют 0,5 г димидия бромида и 0,25 г сульфанового синего в 30 мл горячей смеси растворителей этанол – вода 1:9 и перемешивают. Оба раствора смешивают и доводят объём раствора той же смесью растворителей до 250 мл. 20 мл полученного раствора смешивают с 20 мл 14,0 % (о/о) раствора серной кислоты, предварительно разведённой примерно 250 мл воды, доводят водой до 500,0 мл.

Хранят в защищенном от света месте.

Динатрия арсенат. [10048-95-0]. $Na_2HAsO_4 \cdot 7H_2O$. (М.м. 312,01).

Гидроарсенат(V) динатрия, гептагидрат.

Кристаллы, выветривающиеся на воздухе.

Легко растворим в воде, растворим в глицерине, мало растворим в спирте 96 %. Водный раствор имеет щелочную реакцию по лакмусу.

d_{20}^{20}. Около 1,87.

Температура плавления. Около 57 °С (при быстром нагревании).

Динатрия гидрофосфат безводный. [7558-79-4]. Na_2HPO_4. (М.м. 141,96).

Гидрофосфат динатрия.

Белый кристаллический порошок или бесцветные кристаллы, гигроскопичный.

Легко растворим в воде, очень легко растворим в горячей воде, очень мало растворим в спирте 96 %.

Динатрия гидрофосфата безводного раствор 5 %.

5 г динатрия гидрофосфата безводного растворяют в воде и доводят объём раствора водой до 100,0 мл.

Динатрия гидрофосфата безводного раствор 1 %.

10,0 г динатрия гидрофосфата безводного растворяют в достаточном количестве воды и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл.

Динатрия гидрофосфата безводного раствор 0,2 М.

2,84 г динатрия гидрофосфата безводного растворяют в достаточном количестве воды и доводят объём раствора водой до 100,0 мл.

Динатрия гидрофосфат дигидрат. [10028-24-7]. $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$. (М.м. 177,99).

Гидрофосфат динатрия, дигидрат.

Бесцветные кристаллы, выветриваются на воздухе.

Растворим в воде, очень легко растворим в горячей воде.

Динатрия гидрофосфата раствор 0,5 М.

89,0 г динатрия гидрофосфата дигидрата растворяют в достаточном количестве воды и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл.

Динатрия гидрофосфата раствор 0,2 М.

35,598 г динатрия гидрофосфата дигидрата растворяют в достаточном количестве воды и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл.

Динатрия гидрофосфата раствор 0,05 М.

8,9 г динатрия гидрофосфата дигидрата растворяют в достаточном количестве воды и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл.

Динатрия гидрофосфат додекагидрат. [10039-32-4]. $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$. (М.м. 358,14).

Гидрофосфат динатрия, додекагидрат.

Прозрачные бесцветные кристаллы. Выветриваются на воздухе.

Легко растворим в воде, очень мало растворим в спирте 96 %.

Динатрия гидрофосфата додекагидрата раствор 5 %.

5 г динатрия гидрофосфата додекагидрата растворяют в воде и доводят объём раствора водой до 100 мл.

Динатрия гидроцитрат. [144-33-2]. $C_6H_6Na_2O_7 \cdot 1{,}5H_2O$. (М.м. 263,11).

2-Гидроксипропан-1,2,3-трикарбоксилат динатрия, сесквигидрат.

Порошок белого цвета.

Растворим менее чем в 2 частях воды, практически нерастворим в спирте 96 %.

Динатрия сульфид нонагидрат. См. **Натрия сульфид**.

Динатрия тетраборат. См. **Натрия тетраборат**.

Динатрия тетрабората раствор. См. **Натрия тетрабората раствор**.

Динитробензоилхлорид. [99-33-2]. $C_7H_3ClN_2O_5$. (М.м. 230,56).

3,5-Динитробензоилхлорид.

Кристаллический порошок светло-желтого цвета или желтоватые кристаллы в виде игл.

Растворим в эфире; в воде и спирте 96 % разлагается.

Температура плавления. Около 68 °С.

Динитробензойная кислота. [99-34-3]. $C_7H_4N_2O_6$. (М.м. 212,12).

3,5-Динитробензойная кислота.

Кристаллы почти бесцветные.

Мало растворима в воде, очень легко растворима в спирте 96 %.

Температура плавления. Около 206 °С.

Динитробензойной кислоты раствор 2 %. Раствор 20 г/л в спирте 96 %.

Динитробензол. [528-29-0]. $C_6H_4N_2O_4$. (М.м. 168,11). 1,3-Динитробензол.

Кристаллический порошок или кристаллы желтоватого цвета.

Практически нерастворим в воде, мало растворим в спирте 96 %.

Температура плавления. Около 90 °С.

Динитробензола раствор. Раствор 10 г/л в спирте 96 %.

Динитрофенилгидразин. [119-26-6]. $C_6H_6N_4O_4$. (М.м. 198,14).

(2,4-Динитрофенил)гидразин.

Кристаллы красновато-оранжевого цвета.

Очень мало растворим в воде, мало растворим в спирте 96 % и эфире; растворим в этилацетате.

Температура плавления. Около 203 °С с разложением.

Динитрофенилгидразина уксусно-хлористоводородный раствор.

0,2 г динитрофенилгидразина растворяют в 20 мл метанола, прибавляют 80 мл смеси равных объёмов уксусной кислоты разведённой 30 % и хлористоводородной кислоты 25 % и перемешивают.

Готовят непосредственно перед использованием.

Динитрофенилгидразина сернокислый раствор.

В холодной смеси 10 мл серной кислоты концентрированной и 10 мл воды растворяют 1,5 г динитрофенилгидразина и доводят объём раствора водой до 100 мл.

Динитрофенилгидразина спиртовой раствор.

0,5 г динитрофенилгидразина смешивают с 6 мл хлористоводородной кислоты концентрированной и перемешивают до исчезновения красно-оранжевого окрашивания осадка. Прибавляют 20 мл этанола, нагревают смесь до получения прозрачного раствора, охлаждают и доводят этанолом до 100,0 мл.

Полученный раствор хранят в холодном месте. Срок годности 3 мес.

Динитрофенилгидразина хлористоводородный раствор.

0,50 г динитрофенилгидразина растворяют при нагревании в хлористоводородной кислоте разведённой 7,3 %, доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл, охлаждают и фильтруют.

Готовят непосредственно перед использованием.

2,4-Динитрохлорбензол. [97-00-7]. $C_6H_3ClN_2O_4$. (М.м. 202,55).

2,4-Динитро-1-хлорбензол.

Бледно-желтоватые кристаллы. При быстром нагревании до высокой температуры может взрываться.

Практически нерастворим в воде, растворим в этаноле и эфире.

Динонилфталат. [28553-12-0]. $C_{26}H_{42}O_4$. (М.м. 418,6). Динонил(бензол-1,2-дикарбоксилат) – смесь C_9 изомеров.

Бесцветная или светло-желтого цвета вязкая жидкость.

d_{20}^{20}. От 0,97 до 0,98.

n_D^{20}. От 1,482 до 1,489.

Вода. Не более 0,1 %.

Диоксан. [123-91-1]. $C_4H_8O_2$. (М.м. 88,11). 1,4-Диоксан.

Прозрачная, бесцветная жидкость со слабым приятным запахом.

Смешивается с водой и большинством органических растворителей.

d_{20}^{20}. Около 1,03.

Температура затвердевания. От 9 до 11 °С.

Вода. Не более 0,5 %.

Не перегоняют, если диоксан не выдерживает испытания на пероксиды.

Пероксиды. 8 мл раствора крахмала с калия йодидом помещают в цилиндр с притертой стеклянной пробкой вместимостью 12 мл и диаметром около 1,5 см, заполняют полностью диоксаном и перемешивают. Выдерживают в темном месте в течение 30 мин. Не должно обнаруживаться окрашивание.

Диоксан, используемый для жидкостной сцинтилляции, должен быть соответствующей степени чистоты.

Диоксана исходный раствор 0,1 %.

1,00 г диоксана растворяют в воде и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,00 мл. 5,0 мл полученного раствора доводят водой до 50,0 мл (1,0 мг/мл).

Диоксана раствор 0,05 %.

50,0 мл исходного раствора диоксана доводят водой до 100,0 мл (0,5 мг/мл диоксана).

Диоксана раствор 0,01 %.

10,0 мл 0,05 % раствора диоксана доводят водой до 50,0 мл (0,1 мг/мл диоксана).

Диоксана раствор 0,002 %.

2,0 мл 0,05 % раствора диоксана доводят водой до 50,0 мл (0,02 мг/мл диоксана).

Диоктадецилдисульфид. [2500-88-1]. $C_{36}H_{74}S_2$. (М.м. 571,1).

1,1'-Дисульфандиилдиоктадекан.

Порошок белого цвета. Практически нерастворим в воде.

Температура плавления. От 53 до 58 °С.

Ди(октадецил)-3,3′-тиодипропионат. [693-36-7]. $C_{42}H_{82}O_4S$. (М.м. 683,2).

Диоктадецил(3,3'-сульфандиилдипропаноат).

Кристаллический порошок белого цвета.

Практически нерастворим в воде, легко растворим в метиленхлориде, умеренно растворим в ацетоне, спирте 96 % и петролейном эфире.

Температура плавления. От 58 до 67 °С.

2,2′-Ди(октадецилокси)-5,5′-спироби(1,3,2-диоксафосфаринан). [3806-34-6]. $C_{41}H_{82}O_6P_2$. (М.м. 733,0).

3,9-Бис(октадецилокси)-2,4,8,10-тетраокса-3,9-дифосфаспиро[5.5]ундекан.

Твердое воскообразное вещество белого цвета.

Практически нерастворим в воде, растворим в растворах углеводородов.

Температура плавления. От 40 до 70 °С.

Дисульфин синий. См. **Сульфановый синий**.

Диталимфос. [5131-24-8]. $C_{12}H_{14}NO_4PS$. (М.м. 299,28).

O,*O*-Диэтил-(1,3-диоксо-1,3-дигидро-2*H*-изоиндол-2-ил)фосфонотионат.

Очень мало растворим в воде, в этилацетате и в безводном спирте.

Дитизон. [60-10-6]. $C_{13}H_{12}N_4S$. (М.м. 256,33).

N′,2-Дифенилдиазенкарботиогидразид.

Порошок синевато-черного или коричневато-черного, или черного цвета. Практически нерастворим в воде, растворим в спирте 96 %.

Хранят в защищенном от света месте.

Дитизона раствор 0,05 %. Раствор 0,5 г/л в хлороформе.

Готовят непосредственно перед использованием.

Дитизона раствор 0,0012 % (0,00125 %).

40,0 мг дитизона (или 41,7 мг для получения 0,00125 % раствора) растворяют в хлороформе и доводят объём раствора тем же растворителем до 1000,0 мл. 30,0 мл полученного раствора доводят хлороформом до объёма 100,0 мл.

Установка титра. Количество ртути(II) хлорида, эквивалентное 0,1354 г $HgCl_2$, растворяют в смеси равных объёмов серной кислоты разведённой 9,8 % и воды и доводят объём раствора той же смесью растворителей до 100,0 мл. 2,0 мл полученного раствора доводят смесью равных объёмов серной кислоты разведённой 9,8 % и воды до объёма 100,0 мл (раствор содержит 20 ppm Hg). 1,0 мл полученного раствора помещают в делительную воронку, прибавляют 50 мл серной кислоты разведённой 9,8 %, 140 мл воды и 10 мл раствора 200 г/л гидроксиламина гидрохлорида. Титруют приготовленным раствором дитизона; после каждого прибавления титранта смесь встряхивают 20 раз, к концу титрования смесь оставляют для разделения слоев, затем отбрасывают хлороформный слой и продолжают титровать до синевато-зеленого окрашивания.

Количество ртути (Э) в миллиграммах, эквивалентное содержанию дитизона в 1 мл раствора, вычисляют по формуле: $Э = 20/V$, где V – объём раствора дитизона, израсходованный на титрование, в миллилитрах.

5,5′-Дитиобис(2-нитробензойная кислота). [69-78-3]. $C_{14}H_8N_2O_8S_2$. (М.м. 396,35). 5,5'-Дисульфандиилбис(2-нитробензойная кислота).

Порошок желтого цвета.

Умеренно растворима в спирте 96 %.

Температура плавления. Около 242 °С.

Дитиол. [496-74-2]. $C_7H_8S_2$. (М.м. 156,26).

4-Метилбензол-1,2-дитиол.

Кристаллы белого цвета, гигроскопичны.

Растворим в метаноле и растворах гидроксидов щелочных металлов.

Температура плавления. Около 30 °С.

Хранят в воздухонепроницаемой упаковке.

Дитиола реактив.

1 г дитиола растворяют в 2 мл кислоты тиогликолевой и доводят объём раствора 2 % раствором натрия гидроксида до 250,0 мл.

Готовят непосредственно перед использованием.

Дитиотрейтол. [27565-41-9]. $C_4H_{10}O_2S_2$. (М.м. 154,24).

rac-(2*R*,3*R*)-1,4-Дисульфанилбутан-2,3-диол.

Игольчатые слабо гигроскопичные кристаллы.

Легко растворим в воде, ацетоне и этаноле безводном.

Хранят в воздухонепроницаемой упаковке.

Дифениламин. [122-39-4]. $C_{12}H_{11}N$. (М.м. 169,22).

N-Фениланилин.

Кристаллы белого цвета.

Мало растворим в воде, растворим в спирте 96 %.

Температура плавления. Около 55 °С.

Хранят в защищенном от света месте.

Дифениламина раствор.

0,05 г дифениламина растворяют в смеси 10 мл серной кислоты концентрированной и 2 мл воды.

Дифениламина раствор 0,1 %.

Раствор 1 г/л в серной кислоте концентрированной.

Хранят в защищенном от света месте.

Дифениламина раствор 1 %.

Раствор 10 г/л в серной кислоте концентрированной. Раствор должен быть бесцветным.

Дифениламина уксуснокислый раствор.

1 г дифениламина растворяют в 100 мл уксусной кислоты ледяной и прибавляют 2,75 мл кислоты серной концентрированной.

Готовят непосредственно перед использованием.

Дифенилантрацен. [1499-10-1]. $C_{26}H_{18}$. (М.м. 330,42).

9,10-Дифенилантрацен.

Кристаллический порошок от желтоватого до желтого цвета.

Практически нерастворим в воде, легко растворим в эфире.

Температура плавления. Около 248 °С.

Дифенилбензидин. [531-91-9]. $C_{24}H_{20}N_2$. (М.м. 336,43).

N,*N*′-Дифенил[1,1′-бифенил]-4,4′-диамин.

Кристаллический порошок белого или белого с сероватым оттенком цвета.

Практически нерастворим в воде, мало растворим в ацетоне и спирте 96 %.

Температура плавления. Около 248 °С.

Хранят в защищенном от света месте.

Дифенилборной кислоты аминоэтиловый эфир. [524-95-8]. $C_{14}H_{16}BNO$. (М.м. 225,09). (2-Аминоэтил)дифенилборинат.

Кристаллический порошок белого или слегка желтоватого цвета. Практически нерастворим в воде, растворим в спирте 96 %.

Температура плавления. Около 193 °С.

Дифенилборной кислоты аминоэтилового эфира раствор 1 % в спирте 96 %.

1,0 г дифенилборной кислоты аминоэтилового эфира растворяют в 100 мл спирта 96 %.

Срок годности 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

1,2-Дифенилгидразин. [122-66-7]. $C_{12}H_{12}N_2$. (М.м. 184,24).

1,2-Дифенилгидразин.

Оранжевый порошок.

Температура плавления. Около 125 °С.

***N,N′*-Дифенилгуанидин**. [102-06-7]. $C_{13}H_{13}N_3$. (М.м. 211,26).

N,*N*′-Дифенилгуанидин.

Мелкокристаллический порошок белого или светло-желтого цвета.

Очень мало растворим в воде, легко растворим в спирте 96 %, мало растворим в эфире, умеренно растворим в хлороформе.

Дифенилкарбазид. [140-22-7]. $C_{13}H_{14}N_4O$. (М.м. 242,28).

N′,2-Дифенилгидразин-1-карбогидразид.

Кристаллический порошок белого цвета, постепенно розовеет на воздухе. Очень мало растворим в воде, растворим в ацетоне, спирте 96 % и уксусной кислоте ледяной.

Температура плавления. Около 170 °С.

Сульфатная зола. Не более 0,1 %.

Хранят в защищенном от света месте, в сосудах оранжевого стекла.

Дифенилкарбазида раствор.

0,2 г дифенилкарбазида растворяют в 10 мл уксусной кислоты ледяной и доводят объём раствора этанолом безводным до 100,0 мл.

Готовят непосредственно перед использованием.

Дифенилкарбазон. [538-62-5]. $C_{13}H_{12}N_4O$. (М.м. 240,26).

N′,2-Дифенилдиазенкарбогидразид.

Кристаллический порошок оранжево-желтого цвета.

Практически нерастворим в воде, очень легко растворим в спирте 96 %, хлороформе и бензоле.

Температура плавления. Около 157 °С с разложением.

Раствор индикатора. 1 % раствор в спирте 96 %. Растворение проводят при нагревании. Хранят во флаконах оранжевого стекла. Срок годности 15 сут.

Дифенилкарбазон-ртутный реактив.

Раствор I. 0,1 г дифенилкарбазона растворяют в этаноле безводном и доводят объём раствора тем же растворителем до 50,0 мл.

Раствор II. 1 г ртути(II) хлорида растворяют в этаноле безводном и доводят объём раствора тем же растворителем до 50,0 мл.

Смешивают равные объёмы растворов I и II.

Дифенилоксазол. [92-71-7]. $C_{15}H_{11}NO$. (М.м. 221,25). 2,5-Дифенил-1,3-оксазол.

Порошок белого цвета.

Практически нерастворим в воде, растворим в метаноле, умеренно растворим в диоксане и кислоте уксусной ледяной.

Температура плавления. Около 70 °С с разложением.

$A_{1см}^{1\%}$. Около 1260. Определение проводят при длине волны 305 нм, используя в качестве растворителя метанол.

Дифенилоксазол, используемый для жидкостной сцинтилляции, должен быть соответствующей степени чистоты.

Дифенилфениленоксида полимер. Поли[окси(2,6-дифенил-1,4-фенилен)].

Пористые гранулы шарообразной формы белого или почти белого цвета. Размер гранул указывают в испытаниях, в которых они используются.

Дихлорбензол. [95-50-1]. $C_6H_4Cl_2$. (М.м. 147,00).

1,2-Дихлорбензол.

Бесцветная маслянистая жидкость.

Практически нерастворим в воде, растворим в этаноле безводном и эфире.

d_{20}^{20}. Около 1,31.

Температура кипения. Около 180 °С.

Дихлорметан. См. **Метиленхлорид**.

Дихлорофос. [62-73-7]. $C_4H_7Cl_2O_4P$. (М.м. 220,98).

(2,2-Дихлорэтенил)диметилфосфат.

Жидкость от бесцветного до коричневато-желтого цвета.

Растворим в воде, смешивается с большинством органических растворителей.

n_D^{20}. Около 1,452.

Дихлоруксусная кислота. [79-43-6]. $C_2H_2Cl_2O_2$. (М.м. 128,94).

Дихлоруксусная кислота.

Бесцветная жидкость. Смешивается с водой, спиртом 96 % и эфиром.

d_{20}^{20}. Около 1,566.

n_D^{20}. Около 1,466.

Температура кипения. Около 193 °С.

Дихлоруксусной кислоты раствор.

67 мл дихлоруксусной кислоты доводят водой до 300 мл и нейтрализуют раствором аммиака концентрированным по синей лакмусовой бумаге. Охлаждают, прибавляют 33 мл дихлоруксусной кислоты и доводят водой до 600 мл.

Дихлорфенолиндофенола натриевая соль. [620-45-1].

$C_{12}H_6Cl_2NNaO_2 \cdot 2H_2O$. (М.м. 326,11).

4-[(4-Оксо-3,5-дихлорциклогекса-2,5-диен-1-илиден)амино]фенолят натрия, дигидрат.

Порошок темно-зеленого цвета.

Легко растворима в воде и этаноле безводном.

Водный раствор имеет темно-синюю окраску, которая при подкислении раствора переходит в розовую.

Дихлорфенолиндофенола натриевой соли раствор 0,015 %. 15 мг 2,6-дихлорфенолиндофенола натриевой соли помещают в стакан вместимостью 100 мл, прибавляют прокипяченную горячую водой небольшими порциями, фильтруя каждую порцию раствора через один и тот же фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл. После полного растворения фильтр промывают горячей водой, пока стекающая жидкость не обесцветится и после охлаждения доводят объём раствора водой до метки. Хранить в защищенном от света месте. Срок годности 5 сут.

Дихлорфенолиндофенола натриевой соли титрованный раствор 0,001 М.

50,0 мг дихлорфенолиндофенола натриевой соли растворяют в 100,0 мл воды и фильтруют.

Установка титра. 20,0 мг аскорбиновой кислоты растворяют в 10,0 мл свежеприготовленного 20 % раствора (200 г/л) метафосфорной кислоты и доводят объём раствора водой до 250,0 мл. 5,0 мл полученного раствора быстро титруют приготовленным раствором дихлорфенолиндолфенола из микробюретки с ценой деления 0,01 мл до розового окрашивания, не

исчезающего в течение 10 с, время титрования должно быть не более 2 мин. Раствор дихлорфенолиндолфенола разводят водой до получения раствора, 1 мл которого соответствует 0,1 мг аскорбиновой кислоты $C_6H_8O_6$.

Срок годности 3 сут. Титр устанавливают непосредственно перед использованием.

2,6-Дихлорфенолиндофенолята натрия раствор 0,001 М. См. **Дихлорфенолиндофенола натриевой соли 0,001 М раствор**.

Дихлорфлуоресцеин. [76-54-0]. $C_{20}H_{10}Cl_2O_5$. (М.м. 401,2).

2-(6-Гидрокси-3-оксо-2,7-дихлор-3*H*-ксантен-9-ил)бензойная кислота.

Порошок от желтовато-коричневого до желто-оранжевого цвета.

Мало растворим в воде, легко растворим в спирте 96 % и разведённых растворах гидроксидов щелочных металлов с образованием раствора с желтовато-зеленой флуоресценцией, практически нерастворим в эфире.

2,6-Дихлорхинонхлоримид. [101-38-2]. $C_6H_2Cl_3NO$. (М.м. 210,44).

2,6-Дихлор-4-(хлоримино)циклогекса-2,5-диен-1-он.

Кристаллический порошок от светло-желтого до зеленовато-желтого цвета.

Практически нерастворим в воде, растворим в спирте 96 % и разведённых растворах гидроксидов щелочных металлов.

Температура плавления. Около 66 °С.

2,6-Дихлорхинонхлоримида раствор 1 %.

1,0 г 2,6-дихлорхинонхлоримида растворяют в 100 мл спирта 96 %.

Хранят в прохладном, защищённом от света месте.

Срок годности 30 суток.

2,6-Дихлорхинонхлоримида раствор 0,1 %.

0,1 г 2,6-дихлорхинонхлоримида растворяют в 100 мл спирта 96 %.

Хранят в прохладном, защищённом от света месте.

Срок годности 7 суток.

2,6-Дихлорхинонхлоримида раствор 0,04 %.

0,02 г перекристаллизованного из ацетона 2,6-дихлорхинонхлоримида растворяют в 50 мл свежеперегнанного бутилового или изопропилового спирта.

Хранят на холоду в банке оранжевого стекла.

При появлении розового окрашивания раствор к применению непригоден.

Дихлорэтан. [107-06-2]. $C_2H_4Cl_2$. (М.м. 98,96). 1,2-Дихлорэтан.

Прозрачная, бесцветная жидкость.

Растворим приблизительно в 120 частях воды и 2 частях спирта 96 %, смешивается с эфиром.

d_{20}^{20}. Около 1,25.

Температурные пределы перегонки. От 82 до 84 °С; должно перегоняться не менее 95 %.

Дихлорэтан, насыщенный водой.

Смешивают дихлорэтан с водой в соотношении 1:2, энергично встряхивают в течение 15 – 20 мин и оставляют до разделения слоев. Отбирают дихлорэтановый слой.

Готовят непосредственно перед использованием.

Дициандиамид. См. **Цианогуанидин**.

Дициклогексил. [92-51-3]. $C_{12}H_{22}$. (М.м. 166,30).

1,1'-Би(циклогексан).

d_{20}^{20}. Около 0,864.

Температура *кипения*. Около 227 °С.

Температура плавления. Около 4 °С.

Дициклогексиламин. [101-83-7]. $C_{12}H_{23}N$. (М.м. 181,32).

N-Циклогексилциклогексан-1-амин.

Бесцветная жидкость.

Умеренно растворим в воде, смешивается с большинством органическимх растворителей.

n_D^{20}. Около 1,484.

Температура кипения. Около 256 °С.

Температура затвердевания. 0 – 1 °С.

Дициклогексилмочевина. [2387-23-7]. $C_{13}H_{24}N_2O$. (М.м. 224,34).

N,*N'*-Дициклогексилмочевина.

Кристаллический порошок белого цвета.

Температура плавления. Около 232 °С.

Диэтаноламин. [111-42-2]. $C_4H_{11}NO_2$. (М.м. 105,14).

2,2'-Азандиилди(этан-1-ол).

Прозрачная, вязкая жидкость слегка желтоватого цвета или кристаллы, расплывающиеся на воздухе, плавятся при температуре около 28 °С. Смешивается с водой и спиртом 96 %, легко растворим в ацетоне и эфире.

d_{20}^{20}. Около 1,09.

pH. От 10,0 до 11,5 (5 % раствор).

Диэтиламин. [109-89-7]. $C_4H_{11}N$. (М.м. 73,14).

N-Этилэтан-1-амин.

Прозрачная, бесцветная, воспламеняющаяся жидкость. Имеет сильнощелочную реакцию.

Смешивается с водой и спиртом 96 %. Обращаться с осторожностью.

d_{20}^{20}. Около 0,71.

Температура кипения. Около 55 °С.

Диэтиламиноэтилдекстран.

Анионообменная смола в форме гидрохлорида.

Порошок, образующий с водой гель.

***N,N*-Диэтиланилин**. [91-66-7]. $C_{10}H_{15}N$. (М.м. 149,23).

N,*N*-Диэтиланилин.

Прозрачная, бесцветная или слегка желтоватая воспламеняющаяся жидкость, имеет сильную щелочную реакцию.

Практически нерастворим в воде, легко растворим в спирте 96 % и эфире.

d_{20}^{20}. Около 0,938.

Температура кипения. Около 217 °С.

Температура плавления. Около -38 °С.

Ди(2-этилгексил)фталат. [117-81-7]. $C_{24}H_{38}O_4$. (М.м. 390,56).

Ди(2-этилгексил)(бензол-1,2-дикарбоксилат).

Прозрачная, маслянистая жидкость.

Практически нерастворим в воде, растворим в органических растворителях.

d_{20}^{20}. Около 0,98.

n_D^{20}. Около 1,486.

Вязкость. Около 80 Па·с.

Диэтиленгликоль. [111-46-6]. $C_4H_{10}O_3$. (М.м. 106,12).

2,2′- Оксиди(этан-1-ол).

Содержит не менее 99,5 % (м/м) $C_4H_{10}O_3$.

Прозрачная, бесцветная, гигроскопичная жидкость.

Смешивается с водой, ацетоном и спиртом 96 %.

d_{20}^{20}. Около 1,118.

n_D^{20}. Около 1,447.

Температура кипения. От 244 до 246 °С.

Хранят в воздухонепроницаемой упаковке.

Диэтилфенилендиамина сульфат. [6283-63-2]. $C_{10}H_{16}N_2 \cdot H_2SO_4$. (М.м. 262,32). *N*,*N*-Диэтилбензол-1,4-диамина сульфат (1:1).

Содержит не менее 98 % $C_{10}H_{16}N_2 \cdot H_2SO_4$.

Порошок белого или слегка желтоватого цвета. Растворим в воде.

Температура плавления. Около 185 °С, с разложением.

Хранят в защищенном от света месте.

Диэтилфенилендиамина сульфата раствор.

К 250 мл воды прибавляют 2 мл серной кислоты концентрированной и 25 мл 0,02 М раствора натрия эдетата. В полученном растворе растворяют 1,1 г диэтилфенилендиамина сульфата и доводят объём раствора водой до 1000 мл.

Используют только бесцветный раствор.

Хранят в прохладном, защищенном от света месте. Срок годности 1 мес.

***N*,*N*-Диэтилэтилендиамин**. [100-36-7]. $C_6H_{16}N_2$. (М.м. 116,20).

N,*N*-Диэтилэтан-1,2-диамин.

Содержит не менее 98 % $C_6H_{16}N_2$.

Слегка маслянистая жидкость, бесцветная или слегка желтоватого цвета, с сильным запахом аммиака. Оказывает раздражающее действие на кожу, глаза и слизистые оболочки.

d_{20}^{20}. Около 0,827.

Температура кипения. От 145 до 147 °С.

Вода. Не более 1,0 %. Определение проводят из 0,5 г.

Диэтокситетрагидрофуран. [3320-90-9]. $C_8H_{16}O_3$. (М.м. 160,21).

2,5-Диэтоксиоксолан.

Смесь *цис*- и *транс*- изомеров.

Прозрачная, бесцветная или слегка желтоватого цвета жидкость.

Практически нерастворим в воде, растворим в спирте 96 %, эфире и большинстве других органических растворителей.

d_{20}^{20}. Около 0,98.

n_D^{20}. Около 1,418.

1-Додеканол. См. **Лауриловый спирт**.

Докузат натрия. См. **Натрия докузат**.

D-ДОПА. [5796-17-8]. $C_9H_{11}NO_4$. (М.м. 197,19).

(2*R*)-2-Амино-3-(3,4-дигидроксифенил)пропановая кислота.

Содержит не менее 95 % $C_9H_{11}NO_4$.

Растворим в 1 М хлористоводородной кислоте, практически нерастворим в спирте 96 %.

$[\alpha]_D^{20}$. От +9,5° до +11,5° (1 % раствор в 1 М хлористоводородной кислоте).

Температура плавления. Около 277 °С.

Дотриаконтан. [544-85-4]. $C_{32}H_{66}$. (М.м. 450,9).

Дотриаконтан.

Пластинки белого цвета.

Практически нерастворим в воде, умеренно растворим в гексане, мало растворим в эфире.

Температура плавления. Около 69 °С.

Примеси. Не более 0,1 %. Определение проводят методом газовой хроматографии.

Жженая известь. См. **Кальция оксид**.

Желатин. [9000-70-8].

Очищенный протеин, получаемый при частичном кислотном (тип А) или щелочном (тип Б) гидролизе животного коллагена. Может представлять собой смесь двух типов.

От светло-желтого до слегка желтовато-коричневого цвета твердая масса в виде полупрозрачных пластин, стружек, гранул или порошка.

Практически нерастворим в обычных растворителях. В холодной воде набухает, при нагревании образует коллоидный раствор.

Желатин гидролизованный.

50 г желатина растворяют в 1000 мл воды. Обрабатывают насыщенным паром в автоклаве при температуре 121 °С в течение 90 мин и лиофилизируют.

Железа(III) аммония сульфат. [7783-83-7]. $FeNH_4(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$. (М.м. 482,2). Сульфат аммония железа(III), додекагидрат.

Бледно-лиловые кристаллы, выцветающие на воздухе.

Легко растворим в воде, практически нерастворим в спирте 96 %.

Водный раствор имеет кислую реакцию и с растворами роданидов дает темно-красное окрашивание.

Железа(III) аммония сульфата раствор 30 %.

30 г железа(III) аммония сульфата растворяют в 100 мл воды, к раствору прибавляют азотную кислоту разведённую 16 % до перехода коричневой окраски в желтовато-зеленую.

Железа(III) аммония сульфата раствор 10 %.

10,0 г железа(III) аммония сульфата растворяют в воде, к раствору прибавляют азотной кислоты разведённой 16 % до перехода коричневой окраски в желтовато-зеленую и доводят объём раствора водой до 100,0 мл.

Перед использованием, если необходимо, фильтруют.

Железа(III) аммония сульфата раствор 1,0 %. 1,0 г железа(III) аммония сульфата растворяют в воде и доводят объём раствора водой до 100,0 мл.

Железа(III) аммония сульфата раствор 1,0 % кислый.

1,0 г железа(III) аммония сульфата растворяют в воде, прибавляют 6 мл азотной кислоты разведённой 16 % и доводят объём раствора водой до 100,0 мл.

Железа(III) аммония сульфата раствор 0,20 %.

0,2 г железа(III) аммония сульфата растворяют в воде, подкисляют 6 мл азотной кислоты разведённой 16 % и доводят объём раствора водой до 100,0 мл.

Железа(III) аммония сульфата раствор в азотной кислоте.

Встряхивают 30 г железа(III) аммония сульфата с 40 мл азотной кислоты концентрированной и доводят объём раствора водой до 100,0 мл. Если раствор мутный, его центрифугируют или фильтруют.

Хранят в защищенном от света месте.

Железа(III) аммония сульфата раствор в серной кислоте.

20 г железа(III) аммония сульфата растворяют в 75 мл воды, прибавляют 10 мл раствора 2,8 % (о/о) серной кислоты концентрированной и доводят объём раствора водой до 100,0 мл.

Железа(III) нитрат. [7782-61-8]. $Fe(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$. (М.м. 404,0).

Нитрат железа(III), нонагидрат.

Содержит не менее 99,0 % (м/м) $Fe(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$.

Кристаллы или кристаллическая масса светло-розового цвета.

Очень легко растворим в воде.

Свободная кислота. Не более 0,3 % (в виде HNO_3).

Железа(Ш) нитрата раствор 5 %.

5 г железа(III) нитрата растворяют в воде и доводят объём раствора водой до 100,0 мл.

Железа(II) аммония сульфат. [7783-85-9]. $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$.

(М.м. 392,14).

Дисульфат диаммония железа(II), гексагидрат.

Кристаллы бледного голубовато-зеленоватого цвета или гранулы.

Легко растворим в воде, практически нерастворим в спирте 96 %.

Хранят в защищенном от света месте.

Железа(II) сульфат. [7782-63-0]. $FeSO_4 \cdot 7H_2O$. (М.м. 278,01).

Сульфат железа(II), гептагидрат.

Бледные зеленовато-голубые кристаллы.

Легко растворим в воде, мало растворим в спирте 96 %.

Железа(II) сульфата раствор насыщенный.

К 10 г железа(II) сульфата прибавляют около 20 мл воды, перемешивают до прекращения растворения и фильтруют.

Железа(II) сульфата раствор 5 %.

5 г железа(II) сульфата растворяют в 90 мл воды, свободной от углерода диоксида, и прибавляют 10 мл серной кислоты концентрированной. Готовят непосредственно перед использованием.

Железа(II) сульфата раствор 0,45 % в хлористоводородной кислоте.

0,45 г железа(II) сульфата растворяют в 50 мл 0,1 М раствора хлористоводородной кислоты и доводят объём раствора водой, свободной от углерода диоксида, до 100,0 мл.

Готовят непосредственно перед использованием.

Железа(II) сульфата раствор 0,01 %.

10 мг железа(II) сульфата растворяют в 100 мл воды, свободной от углерода диоксида. Готовят непосредственно перед использованием.

Железа(II) сульфата раствор в серной кислоте.

3 г железа(II) сульфата растворяют в смеси 3 мл свежепрокипяченной и охлажденной воды и 3 мл серной кислоты разведённой 9,8 %.

Готовят непосредственно перед использованием.

Железа(III) сульфат. [10028-25-5]. $Fe_2(SO_4)_3 \cdot xH_2O$.

Сульфат железа(III), водный.

Порошок желтовато-белого цвета, сильно гигроскопичен, разлагается на воздухе.

Растворим в воде, мало растворим в спирте 96 %.

Хранят в воздухонепроницаемой упаковке, в защищенном от света месте.

Железа(III) хлорид. [10025-77-1]. $FeCl_3 \cdot 6H_2O$. (М.м. 270,30). Хлорид железа(III), гексагидрат. Железа окисного хлорид.

Кристаллическая масса желто-оранжевого или коричневого цвета, расплывающаяся на воздухе.

Очень легко растворим в воде, растворим в спирте 96 % и эфире.

Под действием света железа(III) хлорид и его растворы частично восстанавливаются.

Хранят в воздухонепроницаемой упаковке.

Железа(III) хлорида раствор (плотность 1,07 – 1,08). 20,0 г железа(III) хлорида растворяют в 100 мл воды, доводят водой до величины плотности 1,07 – 1,08 и перемешивают.

Срок годности раствора не более 3 мес при хранении в плотно закрытой упаковке, в прохладном защищенном от света месте.

Железа(III) хлорида раствор 30 %.

30,0 г железа(III) хлорида растворяют в воде и доводят объём раствора водой до 100,0 мл.

Срок годности раствора не более 3 мес при хранении в плотно закрытой упаковке, в прохладном защищенном от света месте.

Железа(III) хлорида раствор 10,5 %.

10,5 г железа(III) хлорида растворяют в воде и доводят объём раствора водой до 100,0 мл.

Срок годности раствора не более 3 мес при хранении в плотно закрытой упаковке, в прохладном защищенном от света месте.

Железа(III) хлорида раствор 10 %.

10,0 г железа(III) хлорида растворяют в воде и доводят объём раствора водой до 100,0 мл.

Срок годности раствора не более 3 мес при хранении в плотно закрытой упаковке, в прохладном защищенном от света месте.

Железа(III) хлорида раствор 9 %.

9,0 г железа(III) хлорида растворяют в воде и доводят объём раствора водой до 100,0 мл.

Срок годности раствора не более 3 мес при хранении в плотно закрытой упаковке, в прохладном защищенном от света месте.

Железа(III) хлорида раствор 5 %. 5,0 г железа(III) хлорида растворяют в воде и доводят водой до 100,0 мл.

Железа(III) хлорида раствор 3 %. 3 г железа(III) хлорида растворяют в воде и доводят водой до 100,0 мл.

Железа(III) хлорида раствор 1,3 %. 1,3 г железа(III) хлорида растворяют в воде и доводят объём раствора водой до 100,0 мл.

Железа(III) хлорида раствор 1 %.

1,0 г железа(III) хлорида растворяют в воде и доводят объём раствора водой до 100,0 мл.

Железа(III) хлорида раствор 0,25 %.

0,25 г железа(III) хлорида растворяют в воде и доводят объём раствора водой до 100,0 мл.

Железа(III) хлорида спиртовой раствор 2 %.

2,0 г железа(III) хлорида растворяют в этаноле безводном и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл.

Железа(III) хлорида спиртовой раствор 1 %. 1,0 г железа(III) хлорида растворяют в 100 мл спирта 96 %.

Железа(III) хлорида и сульфаминовой кислоты реактив.

Раствор содержит 1 % (10 г/л) железа(III) хлорида и 1,6 % (16 г/л) сульфаминовой кислоты.

Железо-нитратный реактив.

1,5 г железа(II) сульфата и 1,0 г натрия метабисульфита растворяют в 200 мл воды (раствор А). В 10 мл раствора А растворяют 0,5 г натрия цитрата (раствор Б).

Раствор Б готовят непосредственно перед использованием.

Железа салицилата раствор.

0,1 г железа(III) аммония сульфата растворяют в смеси 2 мл серной кислоты разведённой 9,8 % и 48 мл воды, доводят объём раствора водой до 100,0 мл. К полученному раствору прибавляют 50 мл 1,15 % (11,5 г/л) раствора натрия салицилата, 10 мл уксусной кислоты разведённой 12 %, 80 мл 13,6 % (1136 г/л) раствора натрия ацетата и доводят объём раствора водой до 500,0 мл.

Готовят непосредственно перед использованием.

Хранят в воздухонепроницаемой упаковке, в защищенном от света месте.

Железо. [7439-89-6]. Fe. (А.м. 55,85). Железо.

Порошок серого цвета или проволока.

Растворимо в разведённых неорганических кислотах.

Железо(III) азотнокислое 9-водное. См. **Железа(III) нитрат**.

Железо треххлористое 6-водное. **Железа окисного хлорид**. См. **Железа(III) хлорид**.

Желтая кровяная соль. См. **Калия ферроцианид**.

Желудочный искусственный сок.

2,0 г натрия хлорида и 3,2 г пепсина порошка растворяют в воде, прибавляют 80 мл 1 М раствора хлористоводородной кислоты и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл.

Изатин. [91-56-5]. $C_8H_5NO_2$. (М.м. 147,13).

1*H*-Индол-2,3-дион.

Мелкие кристаллы желтовато-красного цвета.

Мало растворим в воде, растворим в горячей воде, спирте 96 % и эфире, растворим в растворах гидроксидов щелочных металлов с образованием фиолетового окрашивания, переходящего при стоянии в желтое.

Температура плавления. Около 200 °С с частичной сублимацией.

Сульфатная зола. Не более 0,2 %.

Изатина реактив.

6 мг железа(III) сульфата растворяют в 8 мл воды, прибавляют при перемешивании 50 мл серной кислоты концентрированной; к полученному раствору прибавляют 6 мг изатина и перемешивают до растворения.

Раствор должен быть светло-желтого цвета, но не должен иметь оранжевый или красный цвет.

Известковая вода. См. **Кальция гидроксида раствор**.

Известь жженая. См. **Кальция оксид**.

Изоамиловый спирт. [123-51-3]. $C_5H_{12}O$. (М.м. 88,15). 3-Метилбутан-1-ол.

Бесцветная жидкость.

Мало растворим в воде, смешивается со спиртом 96 % и эфиром.

Температура кипения. Около 130 °С.

Изобутиловый спирт. См. **2-Метилпропанол**.

L-Изолейцин. [73-32-5]. $C_6H_{13}NO_2$. (М.м. 131,17).

(2*S*,3*S*)-2-Амино-3-метилпентановая кислота.

Кристаллический порошок белого цвета. Растворим в воде, мало растворим в спирте.

$[\alpha]_D^{20}$. От + 38,6 до + 42,5° (4 % раствор в 6 М хлористоводородной кислоте).

Температура плавления. Около 290 °С с разложением.

Изоментол. [23283-97-8]. $C_{10}H_{20}O$. (М.м. 156,27).

(+)-Изоментол: (1*S*,2*R*,5*R*)-5-Метил-2-(пропан-2-ил)циклогексан-1-ол.

(±)-Изоментол: *rac*-(1*R*,2*S*,5*S*)-5-Метил-2-(пропан-2-ил)циклогексан-1-ол.

Бесцветные кристаллы.

Практически нерастворим в воде, очень легко растворим в спирте 96 % и эфире.

$[\alpha]_D^{20}$. (+)-Изоментол: около + 24° (10 % раствор в спирте 96 %).

Температура кипения. (+)-Изоментол: около + 218 °С. (±)-Изоментол: около + 218 °С.

Температура плавления. (+)-Изоментол: около + 80 °С. (±)-Изоментол: около + 53 °С.

(+)-Изоментон. [1196-31-2]. $C_{10}H_{18}O$. (М.м. 154,25).

(2*R*,5*R*)-5-Метил-2-(пропан-2-ил)циклогексан-1-он.

Содержит различные количества ментона.

Бесцветная жидкость.

Очень мало растворим в воде, растворим в спирте 96 % и эфире.

d_{20}^{20}. Около 0,904.

n_D^{20}. Около 1,453.

$[\alpha]_D^{20}$. Около + 93,2°.

Хроматографическая чистота изоментона, применяемого в газовой хроматографии, должна быть не менее 80,0 %.

Изооктан. См. **Триметилпентан**.

Изопентан. См. **2-Метилбутан**.

Изопропиламин. [75-31-0]. C_3H_9N. (М.м. 59,11). Пропан-2-амин.

Бесцветная, сильно летучая, воспламеняющаяся жидкость.

n_D^{20}. Около 1,374.

Температура кипения. От 32 до 34 °С.

Изопропилйодид. См. **2-Йодпропан**.

Изопропилмиристат. [110-27-0]. $C_{17}H_{34}O_2$ (М.м. 270,45).

(Пропан-2-ил)тетрадеканоат.

Прозрачная, бесцветная, маслянистая жидкость.

Не смешивается с водой, смешивается со спиртом 96 %, метиленхлоридом, жирными маслами и с вазелиновым маслом.

d_{20}^{20}. Около 0,850.

n_D^{20}. Около 1,435.

Изопропиловый спирт. См. **2-Пропанол**.

4-Изопропилфенол. [99-89-8]. $C_9H_{12}O$. (М.м. 136,19).

4-(Пропан-2-ил)фенол.

Содержит не менее 98 % $C_9H_{12}O$.

Температура кипения. Около 212 °С.

Температура плавления. От 59 до 61 °С.

Имидазол. [288-32-4]. $C_3H_4N_2$. (М.м. 68,08).

1*H*-Имидазол.

Кристаллический порошок белого цвета.

Растворим в воде и спирте 96 %.

Температура плавления. Около 90 °С.

Иминодибензил. [494-19-9]. $C_{14}H_{13}N$. (М.м. 195,26).

10,11-Дигидро-5*H*-дибенз[*bf*]азепин.

Кристаллический порошок бледно-желтого цвета.

Практически нерастворим в воде, легко растворим в ацетоне.

Температура плавления. Около 106 °С.

Индигокармин. [860-22-0]. $C_{16}H_8N_2Na_2O_8S_2$. (М.м. 466,4).

(2*E*)-3,3′-Диоксо-1,1',3,3'-тетрагидро[2,2′-бииндолилиден]-5,5′-дисульфонат динатрия.

Обычно содержит натрия хлорид.

Порошок от синего до фиолетово-синего цвета или гранулы синего цвета с медным блеском.

Умеренно растворим в воде, практически нерастворим в спирте 96 %. Осаждается из водного раствора натрия хлоридом.

Растворы индигокармина синего цвета, под влиянием восстановителей обесцвечиваются.

Переход окраски раствора от синей к желтой в интервале pH 11,6 – 14,0.

Растворы индикатора: 1. 0,1 % раствор. 2. 0,25 % раствор.

Растворение проводят в горячей воде. Как окислительно-восстановительный индикатор применяют 0,25 % раствор.

Индигокармина раствор.

0,2 г индигокармина растворяют в смеси 10 мл хлористоводородной кислоты концентрированной и 990 мл 20 % раствора серной кислоты, свободной от азота.

Раствор должен выдерживать следующее испытание.

10 мл полученного раствора прибавляют к раствору 1,0 мг калия нитрата в 10 мл воды, тотчас прибавляют 20 мл серной кислоты, свободной от азота, и нагревают до кипения. Синее окрашивание раствора должно исчезнуть в течение 1 мин.

Индигокармина раствор 0,4 %.

4 г индигокармина растворяют в воде, прибавляя воду отдельными порциями до объёма 900 мл, затем прибавляют 2 мл серной кислоты концентрированной и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл.

Установка титра. 10,0 мл эталонного раствора нитрата (100 ppm нитрат-иона) смешивают с 10 мл воды, 0,05 мл 0,4 % раствора индигокармина и тотчас прибавляют (за один раз, но осторожно) 30 мл серной кислоты концентрированной. Полученный раствор немедленно титруют приготовленным 0,4 % раствором индигокармина до стабильной синей окраски.

Количество миллилитров раствора индигокармина, израсходованное на титрование, соответствует 1 мг нитрат-иона.

Индофеноловый синий. [132-31-0]. $C_{18}H_{16}N_2O$. (М.м. 276,33).

4-{[4-(Диметиламино)фенил]имино}нафталин-1(4*H*)-он.

Порошок фиолетово-черного цвета. Практически нерастворим в воде.

Хроматография. Определение проводят методом тонкослойной хроматографии, используя в качестве тонкого слоя силикагель G. На хроматографическую пластинку наносят 10 мкл 0,01 % раствора в метиленхлориде и хроматографируют в этом же растворителе. Фронт

растворителя должен пройти не менее 10 см. На хроматограмме должно обнаруживаться только одно основное пятно. Допускается пятно на старте.

Йод. I_2. [7553-56-2]. I_2. (М.м. 253,81). Иод.

Сухие тяжелые фиолетово-черные с металлическим блеском кристаллические пластинки или кусочки, или мелкокристаллический порошок. Летуч при комнатной температуре.

Очень мало растворим в воде, растворим в этаноле, мало растворим в глицерине, очень легко растворим в концентрированных растворах йодидов.

Йода раствор 0,05 М.

14 г йода растворяют в 100 мл 40 % раствора калия йодида, прибавляют 1 мл кислоты хлористоводородной разведённой 7,3 % и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл.

Хранят в защищенном от света месте.

Йода раствор 0,005 М.

К 10,0 мл 0,05 М раствора йода прибавляют 0,6 г калия йодида и доводят объём раствора водой до 100,0 мл.

Готовят непосредственно перед использованием.

Йода раствор 0,001 М.

10,0 мл 0,1 М раствора йода помещают в мерную колбу вместимостью 1 л, прибавляют 0,6 г калия йодида, перемешивают и доводят объём раствора водой до метки.

Готовят непосредственно перед использованием.

Йода раствор 0,0005 М.

К 10,0 мл 0,05 М раствора йода прибавляют 0,6 г калия йодида и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл.

Готовят непосредственно перед использованием.

Йода раствор 0,0001 М.

2,0 мл 0,005 М раствора йода доводят водой до 100,0 мл.

Готовят непосредственно перед использованием.

Йода раствор спиртовой 5 %. Раствор 50 г/л в спирте 96 %.

Хранят в защищенном от света месте.

Йода раствор спиртовой 1 %. Раствор 10 г/л в спирте 96 %.

Хранят в защищенном от света месте.

Йода бромид. [7789-33-5]. IBr. (М.м. 206,81). Бромид иода(I).

Кристаллы от синевато-черного до коричневато-черного цвета.

Легко растворим в воде, спирте 96 %, эфире и уксусной кислоте ледяной.

Температура кипения. Около 116 °С.

Температура плавления. Около 40 °С.

Хранят в прохладном, защищенном от света месте.

Йода бромида раствор.

20 г йода бромида растворяют в уксусной кислоте ледяной и доводят объём раствора тем же растворителем до 1000,0 мл.

Хранят в защищенном от света месте.

Йода монохлорид. [7790-99-0]. ICl. (М.м. 162,36). Хлорид иода(I).

Кристаллы черного цвета.

Растворимы в воде, уксусной кислоте и спирте 96 %.

Температура кипения. Около 97,4 °С.

Хранят в прохладном, защищенном от света месте.

Йода монохлорида раствор. Раствор йода монохлорида готовят одним из описанных ниже методов.

1. 1,4 г йода монохлорида растворяют в уксусной кислоте ледяной и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл.
2. 13,0 г мелкорастертого йода растворяют при встряхивании в смеси 300 мл углерода четыреххлористого и 700 мл уксусной кислоты ледяной. К 20 мл этого раствора прибавляют 15 мл 10 % раствора калия йодида, 100 мл воды и титруют 0,1 М раствором натрия тиосульфата. Затем через раствор пропускают сухой газообразный хлор до тех пор, пока на титрование 20 мл полученного раствора будет расходоваться двойное количество, но не большее, тиосульфата натрия.

3. 8,0 г йода трихлорида растворяют в 200 мл уксусной кислоты ледяной, растворяют 9 г йода в 300 мл углерода четыреххлористого, смешивают оба раствора и прибавляют уксусную кислоту ледяную до 1000,0 мл.

Раствор йода монохлорида хранят в закрытом сосуде в прохладном месте.

Йода трихлорид. [865-44-1]. ICl_3. (М.м. 233,27). Хлорид иода(III).

Красновато-оранжевые кристаллы.

Приготовление йода трихлорида. Над йодом, охлажденным смесью сухого льда с ацетоном до температуры – 78 °С, пропускают газообразный хлор до появления желтых капелек избыточного хлора. Реакционную смесь выдерживают еще в течение нескольких часов в охлажденной бане, после чего перегоняют при комнатной температуре во второй сосуд.

Йода(V) оксид перекристаллизованный. [12029-98-0]. I_2O_5. (М.м. 333,81).

Оксид иода(V).

Содержит не менее 99,5 % I_2O_5.

Кристаллический порошок белого цвета или гранулы от белого до серовато-белого цвета. Гигроскопичен.

Очень легко растворим в воде с образованием HIO_3.

Хранят в воздухонепроницаемой упаковке, в защищенном от света месте.

2-Йодбензойная кислота. [88-67-5]. $C_7H_5IO_2$. (М.м. 248,02).

2-Иодбензойная кислота.

Кристаллический порошок от белого до светло-желтого цвета.

Мало растворима в воде, растворима в спирте 96 %.

Температура плавления. Около 160 °С.

2-Йодгиппуровая кислота. [147-58-0]. $C_9H_8INO_3$. (М.м. 305,07). (2-Иодбензамидо)уксусная кислота.

Кристаллический порошок белого или почти белого цвета.

Умеренно растворима в воде.

Температура плавления. Около 170 °С.

Йодистоводородная кислота. [10034-85-2]. HI. (М.м. 127,91).

Йодистоводородную кислоту перегоняют над красным фосфором, пропуская во время перегонки углерода диоксид или азот. Используют бесцветную или почти бесцветную, кипящую при постоянной температуре смесь (от 55 до 58 % HI), перегоняющуюся при температуре от 126 до 127 °C.

Кислоту помещают в небольшие флаконы из стекла коричневого цвета, предварительно продутые углерода диоксидом или азотом, со стеклянными пробками, герметизируют парафином.

Хранят в защищенном от света месте.

Йодистый метил. См. **Йодметан**.

Йодкрахмальная бумага. См. **Крахмала раствор с калия йодидом**.

Йодметан. [74-88-4]. CH_3I. (М.м. 141,94).

Йодметан.

Бесцветная или желтоватая жидкость.

d_4^{20}. Около 2,28.

n_D^{20}. Около 1,531.

Температура кипения. 41 – 43 °C.

Йодная кислота. [10450-60-9]. H_5IO_6. (М.м. 227,94). Ортоперйодная кислота.

Бесцветные расплывающиеся кристаллы.

Легко растворима в воде, растворима в спирте 96 %, эфире.

Температура плавления. Около 122 °C с разложением.

Йодной и уксусной кислоты раствор.

0,446 г натрия перйодата растворяют в 2,5 мл 25 % (о/о) раствора серной кислоты концентрированной и доводят объём раствора уксусной кислотой ледяной до 100,0 мл.

Йодплатината реактив.

К 3 мл 10 % раствора хлорплатиновой кислоты прибавляют 97 мл воды и 100 мл 6 % раствора калия йодида.

Хранят в защищенном от света месте.

2-Йодпропан. [75-30-9]. C_3H_7I. (М.м. 169,99).

2-Иодпропан.

Бесцветная или желтоватая жидкость.

d_4^{20}. Около 1,703.

n_D^{20}. Около 1,498.

Температура кипения. 88 – 90 °С.

Йодсернистый реактив.

Устройство для приготовления реактива, состоящее из круглодонной колбы вместимостью 3000 – 4000 мл с 3 входными отверстиями для мешалки, термометра и трубки, заполненной осушителем, должно быть закрытым и сухим в процессе подготовки. В колбу помещают 700 мл пиридина безводного и 700 мл монометилового эфира этиленгликоля, прибавляют при постоянном перемешивании 220 г мелкоизмельченного йода, предварительно высушенного над фосфора(V) оксидом. Перемешивание продолжают до полного растворения йода (около 30 мин). Затем охлаждают колбу до температуры – 10 °С и быстро прибавляют при постоянном перемешивании 190 г серы диоксида. Температура реакционной смеси не должна превышать 30 °С. По окончании прибавления смесь охлаждают.

Установка титра. Около 20 мл метанола безводного помещают в сосуд для титрования и титруют приготовленным йодсернистым реактивом (определение воды). Прибавляют точно взвешенное достаточное количество воды и повторяют определение воды. Вычисляют количество воды в миллиграммах, соответствующее 1 мл йодсернистого реактива.

1 мл йодсернистого реактива соответствует как минимум 3,5 мг воды.

Должны быть приняты меры предосторожности для предотвращения воздействия на растворы атмосферной влаги. Титр устанавливают непосредственно перед использованием.

Хранят в воздухонепроницаемой упаковке.

Йодуксусная кислота. [64-69-7]. $C_2H_3IO_2$. (М.м. 185,95).

Иодуксусная кислота.

Бесцветные или белого цвета кристаллы. Растворима в воде и спирте 96 %.

Температура плавления. От 82 до 83 °С.

5-Йодурацил. [696-07-1]. $C_4H_3IN_2O_2$. (М.м. 237,98).

5-Иодпиримидин-2,4(1*H*,3*H*)-дион.

Температура плавления. Около 276 °С с разложением.

Йодэтан. [75-03-6]. C_2H_5I. (М.м. 155,97).

Иодэтан.

Жидкость от бесцветного до слегка желтоватого цвета, под действием воздуха и света темнеет.

Смешивается со спиртом 96 % и большинством органических растворителей.

d_{20}^{20}. Около 1,95.

n_D^{20}. Около 1,513.

Температура кипения. Около 72 °С.

Хранят в воздухонепроницаемой упаковке.

Ионообменная смола сильнокислотная.

Смола в протонированной форме с группами сульфоновой кислоты, присоединенными к решетке, состоящей из полистирола, поперечно-сшитого 8 % дивинилбензола. Выпускают в виде гранул шарообразной формы; если нет других указаний, размер частиц составляет от 0,3 мм до 1,2 мм.

Статическая обменная емкость (СОЕ). От 4,5 до 5,0 ммоль/г при содержании воды от 50 до 60 %.

Приготовление колонки. Если нет других указаний, используют трубку с вплавленным внутрь диском из пористого стекла, длиной 400 мм, внутренним диаметром 20 мм и высотой заполнения около 200 мм. Смолу предварительно смешивают с водой, полученную взвесь вводят в трубку, не допуская образования пузырьков воздуха между частицами. Во время работы жидкость не должна опускаться ниже поверхности смолы. Если смола в протонированной форме, промывают водой до тех пор, пока для нейтрализации 50 мл потребуется не более 0,05 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида, используя в качестве индикатора 0,1 мл 0,1 % спиртового раствора метилового оранжевого. Если смола в натриевой форме или нуждается в регенерации, через колонку медленно пропускают около 100 мл

смеси равных объёмов хлористоводородной кислоты 25 % и воды, а затем промывают водой, как описано выше.

Кадмий. [7440-43-9]. Cd. (А.м. 112,41). Кадмий.

Блестящий металл серебристо-белого цвета.

Практически нерастворим в воде, легко растворим в азотной кислоте и горячей хлористоводородной кислоте.

Кадмия хлорид. [7790-78-5]. $CdCl_2 \cdot 2{,}5H_2O$. (М.м. 228,35).

Хлорид кадмия, гидрат (1:2,5).

Бесцветные полупрозрачные кристаллы или кристаллический порошок, в массе белого цвета.

Очень легко растворим в воде, умеренно растворим в метаноле, слабо растворим в этаноле.

Казеин. [9000-71-9]. Смесь родственных фосфопротеинов, полученных из молока.

Аморфный порошок или гранулы белого цвета.

Очень мало растворим в воде и неполярных органических растворителях, растворим в кислоте хлористоводородной концентрированной с образованием бледно-фиолетового окрашивания.

Образует соли с кислотами и основаниями.

Изоэлектрическая точка казеина находится при значении pH около 4,7.

Щелочные растворы имеют левое вращение плоскости поляризации.

Калий виннокислый. См. **Калия тартрат**.

Калий двууглекислый. См. **Калия гидрокарбонат**.

Калий двухромовокислый. См. **Калия дихромат**.

Калия ацетат. [127-08-2]. $C_2H_3KO_2$. (М.м. 98,14).

Ацетат калия.

Бесцветные кристаллы, расплывающиеся на воздухе.

Легко растворим в воде, растворим в спирте 96 %, практически нерастворим в эфире.

Калия ацетата раствор 10 %.

10 г калия ацетата растворяют при перемешивании в 90 мл воды и доводят объём раствора водой до 100,0 мл.

Калия ацетата раствор 10 % в уксусной кислоте ледяной. Смешивают 10 г калия ацетата с 50 мл уксусной кислоты ледяной, осторожно перемешивают до полного растворения калия ацетата и доводят объём раствора уксусной кислотой ледяной до 100,0 мл.

Калий азотнокислый. См. **Калия нитрат**.

Калия бикарбонат. См. **Калия гидрокарбонат**.

Калия бикарбоната раствор насыщенный метанольный. См. **Калия гидрокарбоната раствор насыщенный метанольный**.

Калия бисульфат. См. **Калия гидросульфат**.

Калия бисульфата раствор 10 %. 10 г калия гидросульфата растворяют в воде и доводят объём раствора водой до 100,0 мл.

Калия бихромат. См. **Калия дихромат.**

Калия бромат. [7758-01-2]. $KBrO_3$. (М.м. 167,00).

Бромат калия.

Кристаллы или гранулированный порошок белого цвета.

Растворим в воде, мало растворим в спирте 96 %.

Калия бромид. [7758-02-3]. KBr (М.м. 119,00).

Бромид калия.

Бесцветные кристаллы или мелкокристаллический порошок.

Легко растворим в воде, мало растворим в спирте 96 %.

Калия бромид, используемый в инфракрасной абсорбционной спектрофотометрии, должен выдерживать следующее дополнительное испытание.

ИК-спектр диска калия бромида толщиной 2 мм, предварительного высушенного при температуре 250 °С в течение 1 ч, должен иметь практически ровную базовую линию в интервале частот от 4000 до 620 $см^{-1}$.

Не должен иметь максимумов с поглощением более 0,02 над базовой линией за исключением максимумов для воды при частотах 3440 и 1630 $см^{-1}$.

Калия бромида раствор 10 %.

10 г калия бромида растворяют в воде и доводят объём раствора водой до 100,0 мл. Хранят в банках с притертыми пробками в защищенном от света месте.

Калия гексацианоферрат(III). См. **Калия феррицианид**.

Калия гидрокарбонат. [298-14-6]. $KHCO_3$. (М.м. 100,11).

Гидрокарбонат калия.

Прозрачные, бесцветные кристаллы.

Легко растворим в воде, практически нерастворим в спирте 96 %.

Калия гидрокарбоната раствор насыщенный метанольный.

0,1 г калия гидрокарбоната растворяют при нагревании в 0,4 мл воды, прибавляют 25 мл метанола и перемешивают круговыми движениями, продолжая нагревание до растворения.

Готовят непосредственно перед использованием.

Калия гидрокарбоната и калия карбоната раствор.

4,0 г калия гидрокарбоната растворяют в 15 мл воды (при нагревании), прибавляют 2,5 г кристаллического калия карбоната и доводят объём раствора водой до 20,0 мл.

Калия гидроксид. [1310-58-3]. KOH. (М.м. 56,11). Гидроксид калия.

Белые куски, цилиндрические палочки или гранулы с кристаллической структурой на изломе. Гигроскопичен.

Очень легко растворим в воде, умеренно растворим в спирте 96 %, практически нерастворим в эфире.

Калия гидроксида раствор 50 %.

50 г калия гидроксида растворяют в воде и доводят объём раствора водой до 100,0 мл. Хранят в стеклянных сосудах с каучуковыми пробками.

Срок годности раствора 1 неделя.

Калия гидроксида раствор 30 %.

30 г калия гидроксида растворяют в воде и доводят объём раствора водой до 100,0 мл. Хранят в стеклянных сосудах с каучуковыми пробками.

Срок годности раствора 1 неделя.

Калия гидроксида раствор 10 %.

10 г калия гидроксида растворяют в воде и доводят объём раствора водой до 100,0 мл. Хранят в стеклянных сосудах с каучуковыми пробками.

Срок годности раствора 1 неделя.

Калия гидроксида раствор 5 %.

5 г калия гидроксида растворяют в воде и доводят объём раствора водой до 100,0 мл. Хранят в стеклянных сосудах с каучуковыми пробками.

Срок годности раствора 1 неделя.

Калия гидроксида раствор 1 %.

1,0 г калия гидроксида растворяют в воде и доводят объём раствора водой до 100,0 мл. Хранят в стеклянных сосудах с каучуковыми пробками.

Срок годности раствора 1 неделя.

Калия гидроксида раствор спиртовой 10 %.

10 г калия гидроксида растворяют в 16 мл воды и доводят объём раствора спиртом 96 %, свободным от альдегидов, до 100,0 мл. Декантируют прозрачный раствор. Раствор должен быть почти бесцветным.

Срок годности раствора не более 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Калия гидроксида раствор спиртовой 5 %.

5 г калия гидроксида растворяют в 8 мл воды и доводят объём раствора спиртом 96 %, свободным от альдегидов, до 100,0 мл. Декантируют прозрачный раствор. Раствор должен быть почти бесцветным.

Срок годности раствора не более 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Калия гидроксида раствор спиртовой 3 %.

3 г калия гидроксида растворяют в 5 мл воды и доводят объём раствора спиртом 96 %, свободным от альдегидов, до 100,0 мл. Декантируют прозрачный раствор. Раствор должен быть почти бесцветным.

Калия гидроксида раствор спиртовой 0,66 %.

6,6 г калия гидроксида растворяют в 50 мл воды и доводят объём раствора спиртом 96 % до 1000,0 мл.

Калия гидроксида раствор в метаноле 3 М.

16,8 г калия гидроксида растворяют в 10 мл воды и доводят объём раствора метанолом до 100,0 мл.

Калия гидроксида раствор спиртовой 2 М.

11,2 г калия гидроксида растворяют в 10 мл воды и доводят объём раствора спиртом 96 % до 100,0 мл.

Калия гидроксида раствор спиртовой 0,5 М.

28 г калия гидроксида растворяют в 100 мл спирта 96 % и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл.

Калия гидроксида раствор 5 % в спирте 50 %.

5 г калия гидроксида растворяют в спирте 50 % и доводят объём раствора спиртом 50 % до 100,0 мл. Декантируют прозрачный раствор. Раствор должен быть почти бесцветным.

Срок годности раствора не более 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Калия гидросульфат. [7646-93-7]. $KHSO_4$. (М.м. 136,17). Гидросульфат калия.

Прозрачные, бесцветные, гигроскопичные кристаллы.

Легко растворим в воде с образованием кислого раствора.

Хранят в воздухонепроницаемой упаковке.

Калия гидротартрат. [868-14-4]. $C_4H_5KO_6$. (М.м. 188,18).

(2*R*,3*R*)-2,3-Дигидроксибутан-1,4-диоат калия (1:1).

Кристаллический порошок белого цвета или бесцветные, слегка матовые кристаллы.

Мало растворим в воде, растворим в кипящей воде, очень мало растворим в спирте 96 %.

Калия гидротартрата насыщенный раствор.

6,4 г калия гидротартрата растворяют в 1000 мл кипящей воды, после охлаждения фильтруют и доводят объём водой до 1000,0 мл.

pH полученного раствора должен быть 3,56 ± 0,02.

Калия гидрофталат. [877-24-7]. $C_8H_5KO_4$. (М.м. 204,22).

Бензол-1,2-дикарбоксилат калия (1:1).

Кристаллы белого цвета. Растворим в воде, мало растворим в спирте 96 %.

Калия гидрофталата раствор 0,2 М.

Раствор калия гидрофталата содержит 40,84 г в пересчете на $C_8H_5KO_4$ в 1000,0 мл воды.

Калия гидрофталата раствор 0,4 %.

0,4 г калия гидрофталата растворяют в 50 мл воды и доводят объём раствора водой до 100 мл.

Калия дигидрофосфат. [7778-77-0]. KH_2PO_4. (М.м. 136,09). Дигидрофосфат калия.

Бесцветные кристаллы. Легко растворим в воде, очень легко растворим в горячей воде, практически нерастворим в спирте 96 %.

Калия дигидрофосфата раствор 0,5 М.

68,050 г калия дигидрофосфата растворяют в достаточном количестве воды и доводят объём раствора тем же растворителем до 1000,0 мл.

Калия дигидрофосфата раствор 0,2 М.

27,22 г калия дигидрофосфата растворяют в достаточном количестве воды и доводят объём раствора тем же растворителем до 1 л.

Калия дигидрофосфата раствор 0,1 М.

Калия дигидрофосфат дважды перекристаллизовывают из воды и высушивают при температуре 110 °С до постоянной массы. 1,36 г перекристаллизованного калия дигидрофосфата растворяют в воде и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл.

Калия дигидрофосфата раствор 0,05 М.

Калия дигидрофосфат дважды перекристаллизовывают из воды и высушивают при температуре 110 °С до постоянной массы. 0,68 г перекристаллизованного калия дигидрофосфата растворяют в воде и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл.

Калия дигидрофосфата раствор 0,03 М.

Калия дигидрофосфат дважды перекристаллизовывают из воды и высушивают при температуре 110 °С до постоянной массы. 4,08 г перекристаллизованного калия дигидрофосфата растворяют в воде и доводят объём раствора тем же растворителем до 1000 мл.

Калия дигидрофосфата раствор 0,02 М.

2,72 г калия дигидрофосфата растворяют в достаточном количестве воды и доводят объём раствора тем же растворителем до 1 л.

Калия дигидрофосфата раствор 0,01 М.

1,36 г калия дигидрофосфата растворяют в достаточном количестве воды и доводят объём раствора тем же растворителем до 1 л.

Калия дихромат. [7778-50-9]. $K_2Cr_2O_7$. (М.м. 294,18). Дихромат дикалия.

Кристаллы оранжево-красного цвета.

Растворим в воде, практически нерастворим в спирте 96 %.

Калия дихромат, используемый для калибровки спектрофотометров, должен содержать не менее 99,9 % $K_2Cr_2O_7$ в пересчете на вещество высушенное при температуре 130 °С.

Количественное определение. Около 1,0 г калия дихромата (точная навеска) растворяют в воде и доводят объём раствора тем же растворителем до 250,0 мл. 50,0 мл полученного раствора помещают в колбу вместимостью 500 мл, прибавляют свежеприготовленный раствор, состоящий из 4,0 г калия йодида, 2,0 г натрия гидрокарбоната и 6,0 мл хлористоводородной кислоты концентрированной в 100 мл воды. Колбу закрывают пробкой, выдерживают в защищенном от света месте в течение 5 мин и титруют 0,1 М раствором

натрия тиосульфата, используя в качестве индикатора 1 мл раствора крахмала, свободного от йодидов.

1 мл 0,1 М раствора натрия тиосульфата соответствует 4,903 мг $K_2Cr_2O_7$.

Калия дихромата раствор 10,6 %. Раствор 106 г/л.

Калия дихромата раствор 5 %. Раствор 50 г/л.

Калия дихромата раствор 0,5 %. Раствор 5 г/л.

Калия дихромата раствор в серной кислоте.

1 г калия дихромата растворяют в 60 мл воды и осторожно прибавляют 7,5 мл серной кислоты концентрированной.

Калий железистосинеродистый. См. **Калия ферроцианид**.

Калий железосинеродистый. См. **Калия феррицианид**.

Калия йодат. [7758-05-6]. KIO_3. (М.м. 214,00).

Иодат калия.

Кристаллический порошок белого цвета.

Растворим в воде, легко растворим в горячей воде; практически нерастворим в спирте 96 %.

Калия йодата раствор 1 %. 1,0 г калия йодата растворяют в воде и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл.

Калия йодата раствор 0,1 М. В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 1,07 г калия йодата, растворяют в воде и доводят объём раствора водой до метки.

Калия йодата раствор 0,005 М.

1,070 г калия йодата растворяют в достаточном количестве воды и доводят объём раствора тем же растворителем до 1000,0 мл.

Калия йодид. [7681-11-0]. KI (М.м. 166,00).

Иодид калия.

Белые кристаллы или белый порошок.

Очень легко растворим в воде, легко растворим в глицерине, растворим в спирте 96 %.

Калия йодида раствор 20 %. 20 г калия йодида растворяют в свежепрокипяченной и охлажденной воде и доводят объём раствора водой до 100 мл. Раствор должен быть бесцветным.

Хранят в банках оранжевого стекла с притёртыми пробками в защищённом от света месте.

Калия йодида раствор 16,6 %. 16,6 г калия йодида растворяют в свежепрокипяченной и охлажденной воде и доводят объём раствора водой до 100,0 мл. Раствор должен быть бесцветным.

Хранят в банках оранжевого стекла с притертыми пробками в защищенном от света месте.

Калия йодида раствор 10 %. 10 г калия йодида растворяют в свежепрокипяченной и охлажденной воде и доводят объём раствора водой до 100,0 мл. Раствор должен быть бесцветным.

Хранят в банках оранжевого стекла с притертыми пробками в защищенном от света месте.

Калия йодида раствор 1 %. 10,0 мл калия йодида раствора 10 % доводят водой до 100,0 мл. Используют свежеприготовленным.

Калия йодида йодированный раствор.

2 г йода и 4 г калия йодида растворяют в 10 мл воды, после полного растворения доводят объём раствора водой до 100,0 мл.

Калия йодида насыщенный раствор.

Насыщенный раствор калия йодида в воде, свободной от углерода диоксида, должен содержать нерастворенные кристаллы.

0,5 мл насыщенного раствора калия йодида смешивают с 30 мл смеси хлороформ – 12 % уксусная кислота 2:3, прибавляют 0,1 мл 0,1 % раствора крахмала; если появляется синее окрашивание, оно должно исчезнуть при прибавлении 0,05 мл 0,1 М раствора натрия тиосульфата.

Хранят в защищенном от света месте.

Калий йодистый. См. **Калия йодид**.

Калий йодновато-кислый. См. **Калия йодат**.

Калия йодовисмутата раствор.

К 0,85 г висмута нитрата основного прибавляют 40 мл воды, 10 мл уксусной кислоты ледяной и 20 мл 40 % раствора калия йодида.

Калия йодовисмутата раствор (1).

100 г винной кислоты растворяют в 400 мл воды, прибавляют 8,5 г висмута нитрата основного, встряхивают в течение 1 ч, прибавляют 200 мл 40 % раствора калия йодида и энергично встряхивают. Выдерживают в течение 24 ч и фильтруют.

Хранят в защищенном от света месте.

Калия йодовисмутата раствор (2).

Исходный раствор. Суспендируют 1,7 г висмута нитрата основного и 20 г винной кислоты в 40 мл воды. К суспензии прибавляют 40 мл 40 % раствора калия йодида, встряхивают в течение 1 ч и фильтруют.

Срок годности раствора несколько дней, при хранении во флаконах оранжевого стекла.

Раствор для опрыскивания. Непосредственно перед использованием смешивают 5 мл исходного раствора с 15 мл воды.

Калия йодовисмутата раствор разведённый.

100 г винной кислоты растворяют в 500 мл воды и прибавляют 50 мл раствора калия йодовисмутата (1).

Хранят в защищенном от света месте.

Калия карбонат. [584-08-7]. K_2CO_3. (М.м. 138,21). Карбонат дикалия.

Гранулированный порошок белого цвета. Гигроскопичен.

Очень легко растворим в воде, практически нерастворим в спирте 96 %, ацетоне.

Хранят в воздухонепроницаемой упаковке.

Калия-натрия тартрат. [6381-59-5]. $C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_2O$. (М.м. 282,22).

(2*R*,3*R*)-2,3-Дигидроксибутан-1,4-диоат калия-натрия, тетрагидрат.

Бесцветные призматические кристаллы.

Легко растворим в воде, очень мало растворим в спирте 96 %.

Калия нафтохинонсульфонат. [5908-27-0]. $C_{10}H_5O_5KS$. (М.м. 276,31).

1,2-Диоксо-1,2-дигидронафталин-4-сульфонат калия.

Порошок желто-оранжевого цвета.

Калий марганцовокислый. См. **Калия перманганат**.

Калий надсернокислый. См. **Калия персульфат**.

Калия нитрат. [7757-79-1]. KNO_3. (М.м. 101,10).

Нитрат калия.

Бесцветные прозрачные кристаллы.

Очень легко растворим в горячей воде, легко растворим в воде; очень мало растворим в спирте 96 %, эфире.

Калия нитрата насыщенный раствор в метаноле.

К 100 мл метанола прибавляют 1 г калия нитрата и встряхивают в течение 5 мин. Используют надосадочную жидкость. Срок годности раствора – 6 мес.

Калия перйодат. [7790-21-8]. KIO_4. (М.м. 230,00).

Периодат калия.

Кристаллический порошок белого цвета или бесцветные кристаллы.

Мало растворим в холодной воде, растворим в горячей воде; очень мало растворим в спирте 96 %.

Калия феррипериодата раствор.

1 г калия перйодата растворяют в 5 мл 12 % свежеприготовленного раствора калия гидроксида, прибавляют 20 мл воды и 1,5 мл 10,5 % раствора железа(III) хлорида, доводят 12 % свежеприготовленным раствором калия гидроксида до объёма 50,0 мл.

Калий фталевокислый кислый. См. **Калия гидрофталат**.

Калия перманганат. [7722-64-7]. $KMnO_4$. (М.м. 158,03). Перманганат калия.

Темно-фиолетовые, почти черные кристаллы с синевато-стальным блеском. Растворим в холодной воде, легко растворим в горячей воде, метаноле, спирте 96 %, ацетоне.

Калия перманганата раствор насыщенный.

9 г калия перманганата заливают 100 мл горячей воды, перемешивают и оставляют на 1 ч, после чего осторожно сливают в банку оранжевого стекла с притертой пробкой.

Хранят в прохладном, защищенном от света месте.

Калия перманганата раствор 5 %.

50 г калия перманганата растворяют в воде и доводят объём раствора тем же растворителем до 1000,0 мл. Раствор хранят при температуре 4 – 8 °С в течение 3 мес.

Калия перманганата раствор 3 %. Раствор 30 г/л.

3 г калия перманганата растворяют в воде и доводят объём раствора водой до 100,0 мл.

Калия перманганата раствор 3 % в фосфорной кислоте.

3 г калия перманганата растворяют в смеси 15 мл фосфорной кислоты концентрированной и 70 мл воды, доводят объём раствора водой до 100,0 мл.

Калия перманганата раствор 3 % в фосфорной кислоте разведённой 10 %.

3 г калия перманганата растворяют при нагревании в 100 мл фосфорной кислоты разведённой 10 %. Раствор хранят при температуре 4 – 8 °С в течение 3 мес.

Калия перманганата раствор 1 % в 1 М серной кислоте.

1,0 г калия перманганата растворяют в 25 мл воды, прибавляют 50,0 мл 2 М серной кислоты и доводят объём раствора водой до 100,0 мл.

Калия перманганата раствор 0,1 %.

0,1 г калия перманганата растворяют в воде и доводят объём раствора водой до 100,0 мл.

Хранят в стеклянных банках с притертыми пробками в защищенном от света месте.

Калия перренат. [10466-65-6]. $KReO_4$. (М.м. 289,30). Перренат калия.

Кристаллический порошок белого цвета.

Растворим в воде, мало растворим в спирте 96 %, метаноле и пропиленгликоле.

Калия персульфат. [7727-21-1]. $K_2S_2O_8$. (М.м. 270,32).

Пероксидисульфат дикалия.

Бесцветные кристаллы или кристаллический порошок белого цвета.

Растворим в воде, практически нерастворим в спирте 96 %. Водные растворы разлагаются при комнатной температуре, быстрее – при нагревании.

Хранят в прохладном месте.

Калия пироантимонат. [12208-13-8]. $KSb(OH)_6$. (М.м. 262,90).

Гексагидроксоантимонат(V) калия.

Кристаллы или кристаллический порошок белого цвета. Умеренно растворим в воде.

Калия пироантимоната раствор.

2,0 г калия пироантимоната растворяют в 95 мл горячей воды, быстро охлаждают, прибавляют раствор, содержащий 2,5 г калия гидроксида в 50 мл воды, и 1 мл 8,5 % раствора натрия гидроксида разведённого. Выдерживают в течение 24 ч, фильтруют и доводят объём раствора водой до 150,0 мл.

Калия плюмбита раствор.

1,7 г свинца(II) ацетата, 3,4 г калия цитрата и 50 г калия гидроксида растворяют в воде и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл.

Калий сернокислый кислый. См. **Калия гидросульфат**.

Калия бисульфат. См. **Калия гидросульфат**.

Калия сульфат. [7778-80-5]. K_2SO_4. (М.м. 174,26).

Сульфат дикалия.

Бесцветные кристаллы.

Растворим в холодной воде, легко растворим в горячей воде, практически нерастворим в спирте 96 %, ацетоне.

Калия сульфата раствор 1 %.

1,0 г калия сульфата растворяют в воде и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл.

Калия тартрат. [6100-19-2]. $C_4H_4K_2O_6 \cdot 0,5H_2O$. (М.м. 235,27).

(2*R*,3*R*)-2,3-Дигидроксибутан-1,4-диоат дикалия, гемигидрат.

Гранулированный порошок или кристаллы белого цвета.

Очень легко растворим в воде, очень мало растворим в спирте 96 %.

Калия тетрайодомеркурата раствор.

1,35 г ртути(II) хлорида растворяют в 50 мл воды, прибавляют 5,0 г калия йодида и доводят объём раствора водой до 100,0 мл.

Калия тетрайодомеркурата щелочной раствор.

11 г калия йодида и 15 г ртути(II) йодида растворяют в воде, доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл. Непосредственно перед использованием полученный раствор смешивают с раствором 250 г/л натрия гидроксида 1:1.

Калия тетрайодомеркурата щелочной раствор (2). Реактив Несслера.

1. К раствору 10,0 г калия йодида в 10 мл воды постепенно прибавляют при постоянном перемешивании насыщенный раствор ртути(II) дихлорида до появления неисчезающего красного осадка. Прибавляют 30,0 г калия гидроксида и после его растворения – еще 1 мл насыщенного раствора ртути(II) дихлорида. Разводят водой до 200 мл, дают отстояться и прозрачную жидкость сливают.
2. 21,5 г калия йодида растворяют в 50 мл воды в колбе вместимостью 300 – 500 мл, прибавляют 39,0 г ртути(II) йодида и перемешивают до полного растворения. 150,0 г калия гидроксида растворяют в отдельной колбе в 200 мл воды и осторожно приливают в смесь растворов калия йодида и ртути(II) йодида. Раствор охлаждают, переносят в колбу оранжевого стекла вместимостью 1000 мл и доводят объём раствора водой до метки. Раствор отстаивают в течение 7 сут до осветления. Прозрачную жидкость сливают.

К 10 мл эталонного раствора аммиака прибавляют 3 капли реактива Несслера, тотчас же должно появиться желтое окрашивание.

Хранят в склянках оранжевого стекла с притертыми пробками в защищенном от света месте.

Калия тетраоксалат. [6100-20-5]. $C_2HKO_4 \cdot C_2H_2O_4 \cdot 2H_2O$. (М.м. 254,19).

Гидрооксалат калия—щавелевая кислота—вода (1/1/2).

Кристаллический порошок белого цвета.

Умеренно растворим в воде, растворим в кипящей воде, мало растворим в спирте 96 %.

Калия тиоцианат. [333-20-0]. KSCN. (М.м. 97,18). Тиоцианат калия.

Бесцветные кристаллы, расплывающиеся на воздухе.

Очень легко растворим в воде и спирте 96 %.

Хранят в воздухонепроницаемой упаковке.

Калия тиоцианата раствор 9,7 %. Раствор 97 г/л.

Калий углекислый. См. **Калия карбонат**.

Калий уксуснокислый. См. **Калия ацетат**.

Калия феррицианид. [13746-66-2]. $K_3[Fe(CN)_6]$. (М.м. 329,26).

Гексацианоферрат(III) трикалия.

Кристаллы красного цвета.

Легко растворим в воде, растворим в ацетоне, очень мало растворим в спирте 96 %.

Калия феррицианида раствор 10 %.

10 г калия феррицианида заливают небольшим количеством воды, растворяют в воде и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл.

Готовят непосредственно перед использованием.

Калия феррицианида раствор 8 %.

8 г калия феррицианида заливают небольшим количеством воды, растворяют в воде и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл.

Готовят непосредственно перед использованием.

Калия феррицианида раствор 5 %.

5 г калия феррицианида заливают небольшим количеством воды, растворяют в воде и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл.

Готовят непосредственно перед использованием.

Калия ферроцианид. [14459-95-1]. $K_4[Fe(CN)_6]\cdot 3H_2O$. (М.м. 422,39). Гексацианоферрат(II) тетракалия, тригидрат.

Прозрачные кристаллы желтого цвета.

Легко растворим в воде, практически нерастворим в спирте 96 %, растворим в ацетоне.

Калия ферроцианида раствор 5,3 %. Раствор 53 г/л.

Калия ферроцианида раствор 5 %.

5 г калия ферроцианида растворяют в воде и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл.

Калия фосфат тригидрат. См. **Трикалия фосфат тригидрат.**

Калия фосфат двузамещенный. См. **Дикалия гидрофосфат**.

Калия фосфат однозамещенный. См. **Калия дигидрофосфат**.

Калий фталевокислый. См. **Калия гидрофталат**.

Калия хлорат. [3811-04-9]. $KClO_3$. (М.м. 122,55). Хлорат калия.

Порошок или гранулы, или кристаллы белого цвета.

Растворим в воде, легко растворим в кипящей воде, очень мало растворим в спирте 96 %.

Калия хлората раствор 5 %.

5 г калия хлората растворяют в воде и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл.

Калия хлорид. [7447-40-7]. KCl. (М.м. 74,55). Хлорид калия.

Белый кристаллический порошок.

Легко растворим в воде, очень легко растворим в горячей воде, очень мало растворим в спирте 96 %.

Калия хлорид, используемый для инфракрасной абсорбционной спектрофотометрии, должен выдерживать следующее дополнительное требование.

ИК-спектр диска калия хлорида толщиной 2 мм, предварительно высушенного при температуре 250 °С в течение 1 ч, должен иметь практически ровную базовую линию в интервале частот от 4000 до 620 $см^{-1}$. Не должен иметь максимумов с поглощением более 0,02 над базовой линией, за исключением максимумов для воды при частотах 3440 и 1630 $см^{-1}$.

Калия хлорида раствор 2 М.

149,1 г калия хлорида растворяют в воде и доводят объём раствора тем же растворителем до 1000,0 мл. Раствор хранят при комнатной температуре в течение 6 мес.

Калия хлорида раствор 10 %.

10,0 г калия хлорида растворяют в воде и доводят объём раствора водой до 100,0 мл

Калия хлорида раствор 0,1 М.

Раствор калия хлорида содержит эквивалент 7,46 г KCl в 1000,0 мл.

5,0 мл калия хлорида раствора 2 М доводят водой до 100,0 мл.

Калия хромат. [7789-00-6]. K_2CrO_4. (М.м. 194,19).

Хромат дикалия.

Кристаллы желтого цвета.

Легко растворим в воде, практически нерастворим в спирте 96 %.

Калия хромата раствор 5 %. Раствор 50 г/л.

Калий хромовокислый. См. **Калия хромат**.

Калия хромат-раствор индикатора. 5 % раствор.

Калия цианид. [151-50-8]. KCN. (М.м. 65,12). Цианид калия.

Кристаллический порошок или масса, или гранулы белого цвета. Яд.

Легко растворим в воде, мало растворим в спирте 96 %.

Калия цианида раствор 10 %. Раствор 100 г/л.

Калия цитрат. [6100-05-6]. $C_6H_5K_3O_7$. (М.м. 324,41).

2-Гидроксипропан-1,2,3-карбоксилат трикалия, моногидрат.

Белый гранулированный порошок или прозрачные кристаллы; гигроскопичен.

Очень легко растворим в воде, практически нерастворим в спирте 96 %.

Кальцион. [3810-39-7]. $C_{30}H_{14}N_4Na_6O_{22}S_6$. (М.м. 1112,8).

4-Гидрокси-3-[(8-гидрокси-3,6-дисульфонатонафталин-1-ил)диазенил]-5-[(1,8-дигидрокси-3,6-дисульфонатонафталин-2-ил)диазенил]нафталин-2,7-дисульфонат гексанатрия.

Черный с фиолетовым оттенком порошок.

Растворим в воде, практически нерастворим в ацетоне, бензоле, спирте 96 %.

В интервале pH 11,0 – 13,0 имеет синюю окраску, а его комплексы с ионом кальция в тех же условиях розового цвета.

Переход окраски раствора при прямом титровании от розовой к синей.

Раствор индикатора. 0,1 % раствор.

Срок годности раствора 1 мес.

Кальция гидроксид. [1305-62-0]. $Ca(OH)_2$. (М.м. 74,09).

Дигидроксид кальция.

Порошок белого цвета.

Практически нерастворим в воде и спирте 96 %, растворим в растворах минеральных кислот и растворе аммония хлорида.

Кальция гидроксида раствор.

1 часть жженой извести гасят 5 частями воды; кашицеобразную массу переносят в бутыль, прибавляют 15 частей воды, сильно взбалтывают и выдерживают в течение 4 – 5 ч. Затем воду сливают и отбрасывают. Остаток обливают 50 частями холодной воды, взбалтывают, укупоривают бутыль и выдерживают в прохладном месте в течение нескольких дней, время от времени взбалтывая.

Для употребления известковую воду по мере надобности сливают с осадка и фильтруют, а к осадку вновь прибавляют воду до первоначального объёма;

взбалтывают и оставляют в прохладном месте в тщательно укупоренной бутыли для получения новой порции известковой воды.

Кальция гидроокиси раствор. См. **Кальция гидроксида раствор**.

Кальция карбонат. [471-34-1]. $CaCO_3$. (М.м. 100,09). Карбонат кальция.

Белый порошок.

Практически нерастворим в воде; растворим в растворах аммония хлорида.

Кальция оксид. [1305-78-8]. CaO. (М.м. 56,08). Оксид кальция.

Белые куски или порошок, слипающийся в комки. На воздухе поглощает воду и двуокись углерода.

Растворим в горячей воде в соотношении 0,66:100 при температуре 80 °С. Реагирует с кислотами.

Кальция сульфат дигидрат. [10101-41-4]. $CaSO_4 \cdot 2H_2O$. (М.м. 172,17). Сульфат кальция, дигидрат.

Белый мелкокристаллический порошок.

Очень мало растворим в воде, растворим в неорганических кислотах, натрия тиосульфате, солях аммония, глицерине.

Кальция сульфата раствор насыщенный.

0,4 г кальция сульфата взбалтывают с 100 мл воды и выдерживают в течение 24 ч, время от времени взбалтывая. Раствор перед употреблением осторожно декантируют.

Кальция сульфат. [10034-76-1]. $CaSO_4 \cdot 0{,}5H_2O$. (М.м. 145,15). Сульфат кальция, гемигидрат.

Порошок белого цвета.

Растворим примерно в 1500 частях воды, практически нерастворим в спирте 96 %.

При смешивании с водой, масса которой равна половине массы кальция сульфата, порошок быстро затвердевает, превращаясь в твердую пористую массу.

Кальция сульфата гемигидрата раствор.

5 г кальция сульфата гемигидрата взбалтывают с 100 мл воды в течение 1 ч и фильтруют.

Кальция хлорид безводный. [10043-52-4]. $CaCl_2$. (М.м. 110,98). Хлорид кальция.

Содержит не менее 98,0 % $CaCl_2$ в пересчете на сухое вещество.

Гранулы белого цвета, расплывающиеся на воздухе.

Очень легко растворим в воде, легко растворим в спирте 96 % и метаноле.

Потеря в массе при высушивании. Не более 5,0 %. Определение проводят в сушильном шкафу при температуре 200 °С.

Хранят в воздухонепроницаемой упаковке, защищая от воздействия влаги.

Кальция хлорида дигидрат. [10035-04-8]. $CaCl_2 \cdot 2H_2O$. (М.м. 147,01). Хлорида кальция дигидрат.

Содержит не менее 99,0 % $CaCl_2 \cdot 2H_2O$.

Очень легко растворим в воде, легко растворим в спирте 96 % и метаноле.

При нагревании выше 175°С теряет кристаллизационную воду.

Кальция хлорида раствор 20 %. 26,5 г кальция хлорида дигидрата растворяют в воде и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл.

Кальция хлорида раствор 7,35 %. 9,74 г кальция хлорида дигидрата растворяют в воде и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл.

Кальция хлорида раствор 0,02 М.

2,94 г кальция хлорида дигидрата растворяют в 900 мл воды, устанавливают pH раствора в пределах от 6,0 до 6,2 и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл.

Хранят при температуре от 2 до 8 °С.

Кальция хлорида раствор 0,01 М.

0,147 г кальция хлорида дигидрата растворяют в воде и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл.

Кальция хлорид тетрагидрат. [25094-02-4]. $CaCl_2 \cdot 4H_2O$. (М.м. 183,05).

Хлорид кальция, тетрагидрат.

Содержит не более 0,05 ppm Fe.

Кальций хлористый. См. **Кальция хлорид**.

Камедь бобов рожкового дерева.

Измельченный эндосперм фруктовых косточек *Ceratonia siliqua* L. *Taub.*

Порошок белого цвета, содержащий от 70 до 80 % растворимой в воде смолы, состоящей в основном из галактоманногликона.

Камфора. [76-22-2]. $C_{10}H_{16}O$. (М.м. 152,23).

rac-(1*R*,4*R*)-1,7,7-Триметилбицикло[2.2.1]гептан-2-он.

Белые кристаллические куски или бесцветный кристаллический порошок с сильным характерным запахом.

Очень мало растворима в воде (0,1:100), легко растворима в спирте 96 % и эфире, растворима в ацетоне.

Хроматографическая чистота камфоры, используемой в газовой хроматографии, должна быть не менее 98,0 %.

Каолин легкий. [1332-58-7].

Очищенный природный алюмосиликат гидратированный. Содержит подходящий диспергатор.

Легкий порошок белого цвета, не содержащий твердых спекшихся частиц, маслянистый на ощупь.

Практически нерастворим в воде и минеральных кислотах.

Крупные частицы. Не более 0,5 %. 5,0 г каолина помещают в цилиндр с притертой стеклянной пробкой длиной около 160 мм и диаметром 35 мм, прибавляют 60 мл 1 % раствора натрия пирофосфата, энергично встряхивают и отстаивают в течение 5 мин. С помощью пипетки отбирают 50 мл жидкости на уровне около 5 см ниже поверхности и отбрасывают. К оставшейся жидкости прибавляют 50 мл воды, встряхивают, отстаивают в течение 5 мин и удаляют 50 мл, как описано выше. Эту операцию повторяют до тех пор, пока не будет удалено в общей сложности 400 мл. Переносят оставшуюся

суспензию в чашку для выпаривания, выпаривают при температуре 100 °С досуха и сушат до постоянной массы при температуре от 100 до 105 °С. Масса остатка должна быть не более 25 мг.

Мелкие частицы. 5,0 г каолина диспергируют в 250 мл воды при энергичном встряхивании в течение 2 мин и тотчас выливают в стеклянный цилиндр диаметром 50 мм. С помощью пипетки отбирают 20 мл, помещают в фарфоровую чашку, выпаривают при температуе 100 °С досуха и сушат до постоянной массы при температуре от 100 до 105 °С. Остаток суспензии отстаивают при температуре 20 °С в течение 4 ч и с помощью пипетки удаляют 20 мл на уровне точно 5 см ниже поверхности, не взбалтывая осадок. Остаток помещают в фарфоровую чашку, выпаривают досуха и сушат до постоянной массы при температуре от 100 до 105 °С. Масса второго остатка должна быть не менее 70 % от массы первого остатка.

Капсаицин. [404-86-4]. $C_{18}H_{27}NO_3$. (М.м. 305,41).

(6*E*)-*N*-[(4-Гидрокси-3-метоксифенил)метил]-8-метилнон-6-енамид.

Белый или практически белый, кристаллический порошок.

Практически нерастворим в воде, легко растворим в безводном спирте.

Температура кипения. 210 – 220 °С при 0,01 мм рт. ст.

Температура плавления. 62 – 65 °С.

Каприловый спирт. См. **Деканол**.

Карбазол. [86-74-8]. $C_{12}H_9N$. (М.м. 167,19).

9*H*-Карбазол.

Кристаллы. Практически нерастворим в воде, легко растворим в ацетоне, мало растворим в этаноле.

Температура плавления. Около 245 °С.

Карбазола раствор 0,5 %.

0,5 г карбазола растворяют в спирте 96 % в мерной колбе вместимостью 100 мл и доводят объём раствора спиртом 96 % до метки.

Карбомер. [9007-20-9].

Поперечно-сшитый полимер акриловой кислоты, после высушивания при температуре 80 °С в течение 1 ч содержит большое количество карбоксильных групп (-COOH, от 56 до 68 %).

Средняя молекулярная масса около $3 \cdot 10^6$.

pH. Около 3,0 (1 % суспензия).

Карбофенотион. [786-19-6]. $C_{11}H_{16}ClO_2PS_3$. (М.м. 342,87). *O*,*O*-Диэтил-*S*-{[(4-хлорфенил)сульфанил]метил}дитиофосфат.

Жидкость желтоватого цвета.

Практически нерастворим в воде, смешивается с органическими растворителями.

d_4^{25}. Около 1,27.

Карвакрол. [499-75-2]. $C_{10}H_{14}O$. (М.м. 150,22).

2-Метил-5-(пропан-2-ил)фенол.

Жидкость коричневатого цвета.

Практически нерастворим в воде, очень легко растворим в спирте 96 % и эфире.

d_{20}^{20}. Около 0,975.

n_D^{20}. Около 1,523.

Температура кипения. Около 237 °С.

Хроматографическая чистота карвакрола, используемого в газовой хроматографии, должна быть не менее 95,0 %.

Карвон. [2244-16-8]. $C_{10}H_{14}O$. (М.м. 150,22).

(5*S*)-2-Метил-5-(пропан-2-ил)циклогекс-2-ен-1-он.

Жидкость.

Практически нерастворим в воде, смешивается со спиртом 96 %.

d_{20}^{20}. Около 0,965.

n_D^{20}. Около 1,500.

$[\alpha]^{20}_D$. Около + 61°.

Температура кипения. Около 230 °С.

Хроматографическая чистота карвона, используемого в газовой хроматографии, должна быть не менее 98,0 %.

Катехин. [154-23-4]. $C_{15}H_{14}O_6$. (М.м. 290,27). (2*R*,3*S*)-2-(3,4-Дигидроксифенил)-2*H*-1-бензопиран-3,5,7-триол.

Бесцветные кристаллы или игольчатые образования.

Растворим в воде и спирте 96 %, мало растворим в эфире, очень мало растворим в ацетоне.

Катионит слабый.

Смола полиметакриловая слабокислая, содержащая карбоксильные группы в протонированной форме.

Размер частиц. От 75 до 160 мкм.

Используемые пределы pH. От 5,0 до 14,0.

Максимальная температура использования. 120 °С.

Катионит слабоосновный. См. **Катионит слабый.**

Катионообменная смола.

Смола в протонированной форме с группами сульфоновой кислоты, присоединенными к решетке полимера, состоящего из полистирола, поперечно-сшитого 8 % дивинилбензола. Выпускают в виде гранул, размер которых указывают после названия реактива в испытаниях, в которых он используется.

Катионообменная смола (1).

Смола в протонированной форме с группами сульфоновой кислоты, присоединенными к решетке полимера, состоящего из полистирола, поперечно-сшитого 4 % дивинилбензола. Выпускают в виде гранул, размер которых указывают после названия реактива в испытаниях, в которых он используется.

Катионообменная смола сильная (кальциевая форма).

Смола в кальциевой форме с группами сульфоновой кислоты, присоединенными к решетке полимера, состоящего из полистирола,

поперечно-сшитого 8 % дивинилбензола. Размер частиц указывают после названия реактива в фармакопейных статьях.

Католит для изоэлектрофокусировки pH от 3 до 5 (0,1 М раствор β-аланина).

8,9 г β-аланина растворяют в воде и доводят объём раствора тем же растворителем до 1000 мл.

Квасцы железоаммониевые. См. **Железа(III) аммония сульфат**.

Кетостеариловый спирт. [67762-27-0]. Смесь твердых алифатических спиртов. В его составе должно быть не менее 40 % стеарилового спирта ($C_{18}H_{38}O$; М.м. 270,49); сумма стеарилового спирта и цетилового спирта ($C_{16}H_{34}O$; М.м. 242,49) должна быть не менее 90,0 %.

Белая или светло-желтая воскообразная масса, пластинки, хлопья или гранулы.

Практически нерастворим в воде, легко растворим в эфире, растворим в спирте 90 % (о/о); в расплавленном состоянии смешивается с жирными маслами, вазелиновым маслом.

Кизельгур G.

Состоит из кизельгура, обработанного хлористоводородной кислотой и кальцинированного прибавлением около 15 % кальция сульфата полугидрата.

Мелкий порошок серовато-белого цвета; при растирании с водой серый цвет становится более выраженным. Средний размер частиц от 10 до 40 мкм.

Кальция сульфат. Определение проводят методом, указанным для силикагеля G.

pH. От 7,0 до 8,0. Измеряют pH суспензии, полученной встряхиванием 1 г в 10 мл воды, свободной от углерода диоксида, в течение 5 мин.

Хроматографическая разделяющая способность. Определение проводят методом тонкослойной хроматографии. Пластинки готовят, используя взвесь кизельгура G с 2,7 г/л раствором натрия ацетата. На линию старта хроматографической пластинки наносят 5 мкл раствора, содержащего по 0,1 г/л лактозы, сахарозы, глюкозы и фруктозы в пиридине. Хроматографируют в системе растворителей вода – 2-пропанол – этилацетат 12:23:65. Время прохождения фронта растворителей на расстояние 14 см

около 40 мин. Пластинку сушат на воздухе, опрыскивают раствором анисового альдегида, расходуя около 10 мл, и нагревают при температуре от 100 до 105 °С в течение 5 мин. На хроматограмме должны обнаруживаться 4 четких, хорошо разделенных, без «хвостов», пятна.

Кизельгур для хроматографии.

Легкий порошок белого или желтовато-белого цвета.

Практически нерастворим в воде, разведённых кислотах и органических растворителях.

Скорость фильтрации. Используют хроматографическую колонку размером 0,25 м × 10 мм с пластинкой из пористого стекла (100) и двумя отметками на высоте 0,10 м и 0,20 м над пластинкой. Колонку заполняют испытуемым веществом до первой отметки, а до второй отметки – водой. Когда первые капли начинают вытекать из колонки, снова заполняют до второй отметки водой и измеряют время вытекания из колонки первых 5 мл воды. Скорость потока должна быть не менее 1 мл/мин.

Цветность. Элюат, полученный при испытании на скорость фильтрации, должен быть бесцветным.

Кислотность или щелочность. К 1,00 г прибавляют 10 мл воды, энергично взбалтывают и выдерживают в течение 5 мин. Суспензию фильтруют через фильтр, предварительно промытый горячей водой до нейтральной реакции в промывной воде. К 2,0 мл фильтрата прибавляют 0,05 мл 0,05 % раствора метилового красного; наблюдается желтое окрашивание. К 2,0 мл фильтрата прибавляют 0,05 мл 1 % раствора фенолфталеина; допускается слабо-розовое окрашивание раствора.

Водорастворимые вещества. 10,0 г помещают в хроматографическую колонку размером 0,25 м × 10 мм, элюируют водой, собирая первые 20 мл элюата, выпаривают досуха, остаток сушат при температуре от 100 до 105 °С. Масса остатка должна быть не более 10 мг.

Железо. Не более 0,02 % (200 ppm). К 0,50 г прибавляют 10 мл смеси равных объёмов 25 % хлористоводородной кислоты и воды, энергично встряхивают, выдерживают в течение 5 мин и фильтруют.

1,0 мл фильтрата должен выдерживать испытание на железо.

Потеря в массе после прокаливания. Не более 0,5 %. Во время прокаливания (600 °С) вещество не должно иметь коричневую или черную окраску.

Кислород. [7782-44-7]. O_2. (М.м. 32,00). Кислород.

Содержит не менее 99,99 % (о/о) O_2.

Азот и аргон. Не более 100 ppm.

Углерода диоксид. Не более 10 ppm.

Углерода монооксид. Не более 5 ppm.

Кислотный синий 1. См. **Сульфановый синий**.

Кислотный синий 83. [6104-59-2]. $C_{45}H_{44}N_3NaO_7S_2$. (М.м. 826,0).

3-[({4-[(4-{[(3-Сульфонатофенил)метил](этил)амино}фенил){4-[(4-этоксифенил)амино]фенил}метилен]циклогекса-2,5-диен-1-илиден}(этил)аммонио)метил]бензолсульфонат натрия.

Порошок коричневого цвета.

Практически нерастворим в холодной воде, мало растворим в кипящей воде и этаноле, растворим в серной кислоте концентрированной, уксусной кислоте ледяной и разведённых растворах гидроксидов щелочных металлов.

Кумасси красящий раствор.

Раствор 1,25 г/л кислотного синего 83 в смеси растворителей уксусная кислота ледяная – метанол – вода 1:4:5. Фильтруют.

Обесцвечивающий раствор для Кумасси красящего раствора.

Смесь растворителей уксусная кислота ледяная – метанол – вода 1:4:5.

Кислотный синий 90. [6104-58-1]. $C_{47}H_{48}N_3NaO_7S_2$. (М.м. 854,0).

3-({[3-Метил-4-({4-[(4-этоксифенил)амино]фенил}(2-метил-4-{[(3-сульфонатофенил)метил](этил)амино}]фенил)метилен)циклогекса-2,5-диен-1-илиден](этил)аммонио}метил)бензолсульфонат натрия.

Порошок темно-коричневого цвета с фиолетовым блеском и с вкрапленными частицами, имеющими металлический блеск.

Растворим в воде и этаноле.

Потеря в массе при высушивании. Не более 5,0 %. 0,500 г сушат в сушильном шкафу при температуре от 100 до 105 °С.

$A_{1см}^{1\%}$. Более 500, в пересчете на сухое вещество. Определение проводят при длине волны 577 нм, используя 0,001 % раствор в буферном растворе pH 7,0.

Кислотный синий 92. [3861-73-2]. $C_{26}H_{16}N_3Na_3O_{10}S_3$. (М.м. 695,6).

5-Гидрокси-4-{[5-сульфонато-4-(фениламино)нафталин-1-ил]диазенил}нафталин-2,7-дисульфонат тринатрия.

Кристаллы темно-синего цвета.

Мало растворим в спирте 96 %, растворим в воде, ацетоне и моноэтиловом эфире этиленгликоля.

Кислотного синего 92 раствор.

0,5 г кислотного синего 92 растворяют в смеси 10 мл уксусной кислоты ледяной, 45 мл спирта 96 % и 45 мл воды.

Кислотный хром черный специальный. См. **Эриохром черный Т**.

Кислотный хромовый темно-синий. См. **Хромовый темно-синий**.

1,7-Клеве кислота. См. **1-Нафтиламин-7-сульфоновая кислота.**

Клобетазола пропионат. [25122-46-7]. $C_{25}H_{32}ClFO_5$. (М.м. 467,0).

(11β-Гидрокси-16β-метил-3,20-диоксо-9-фтор-21-хлорпрегна-1,4-диен-17-ил)пропаноат.

Кристаллический порошок белого цвета.

Практически нерастворим в воде, растворим в спирте 96 % и ацетоне.

$[\alpha]_D^{20}$. Около + 104° (в диоксане).

Температура плавления. Около 196 °С.

Кобальта нитрат. [10026-22-9]. $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$. (М.м. 291,03).

Нитрат кобальта(II), гексагидрат.

Буро-красные кристаллы. Гигроскопичен. Очень легко растворим в воде.

Кобальта нитрата раствор 5 %.

5 г кобальта нитрата растворяют в воде и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл.

Кобальта хлорид. [7791-13-1]. $CoCl_2 \cdot 6H_2O$. (М.м. 237,93). Хлорид кобальта(II), гексагидрат.

Кристаллический порошок красного цвета или кристаллы темно-красного цвета.

Очень легко растворим в воде, растворим в спирте 96 %.

Кобальта хлорида раствор 5 %.

5 г кобальта хлорида растворяют в воде, прибавляют 0,2 мл хлористоводородной кислоты 25 % и доводят объём раствора водой до 100,0 мл.

Конго красный. [573-58-0]. $C_{32}H_{22}N_6Na_2O_6S_2$. (М.м. 696,7). 3,3'-[[1,1'-Бифенил]-4,4'-диилбис(диазендиил)]бис(4-аминонафталин-1-сульфонат) динатрия.

Порошок коричневато-красного цвета. Растворим в воде.

Конго красного бумага.

Полоски фильтровальной бумаги погружают на несколько минут в раствор конго красного. Высушивают.

Конго красного раствор.

0,1 г конго красного растворяют в смеси 20 мл спирта 96 % и воды и доводят объём раствора водой до 100,0 мл.

Испытание на чувствительность. К 100 мл воды, свободной от углерода диоксида, прибавляют 0,2 мл раствора конго красного и 0,3 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида; появляется синее окрашивание, которое переходит в розовое при прибавлении не более 0,3 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида.

Переход окраски от синей до розовой в интервале pH 3,0 – 5,0.

Коричный альдегид. [104-55-2]. C_9H_8O. (М.м. 132,16). 3-Фенилпроп-2-еналь.

Маслянистая жидкость от желтоватого до зеленовато-желтого цвета.

Мало растворим в воде, очень легко растворим в спирте 96 % и эфире.

d_{20}^{20}. От 1,048 до 1,051.

n_D^{20}. Около 1,620.

Хранят в прохладном, защищенном от света месте.

Кофейная кислота. [331-39-5]. $C_9H_8O_4$. (М.м. 180,16).

(2*E*)-3-(3,4-Дигидроксифенил)проп-2-еновая кислота.

Кристаллы или пластинки белого или почти белого цвета.

Легко растворима в горячей воде и спирте 96 %, умеренно растворима в холодной воде.

Температура плавления. Около 225 °С с разложением.

Свежеприготовленный раствор с pH 7,6 имеет 2 максимума поглощения при длинах волн 293 и 329 нм.

Красная кровяная соль. См. **Калия феррицианид**.

Крахмал растворимый. [9005-84-9]. $(C_6H_{10}O_5)_n$.

Порошок белого или слегка кремоватого цвета.

Практически нерастворим в спирте 96 %, растворим в кипящей воде с образованием прозрачного или слегка опалесцирующего раствора, не застывающего при охлаждении.

Крахмала раствор 1 %.

1 г крахмала растворимого смешивают с 5 мл воды до получения однородной кашицы и смесь медленно вливают при постоянном размешивании в 100 мл кипящей воды. Кипятят в течение 2 мин до получения слегка опалесцирующей жидкости.

Срок годности раствора 3 сут.

Примечание. При приготовлении раствора индикатора из картофельного крахмала клейстер, полученный указанным выше образом, дополнительно нагревают в автоклаве при температуре 120 °С в течение 1 ч.

Крахмала раствор 1 %, содержащий 0,01 % ртути(II) йодида.

1,0 г крахмала растворимого растирают в порошок с 5 мл воды, полученную смесь медленно при постоянном перемешивании вливают в 100 мл кипящей воды, содержащей 10 мг ртути(II) йодида.

При использовании реактива каждый раз проводят испытание на чувствительность.

Испытание на чувствительность. Смесь, состоящая из 1 мл раствора крахмала, 20 мл воды, около 50 мг калия йодида и 0,05 мл 0,005 М раствора йода, должна иметь синее окрашивание.

Крахмала раствор 0,5 % содержащий 0,125 % салициловой кислотой.

1 г крахмала растворимого смешивают с небольшим количеством холодной воды. Полученную смесь прибавляют к 200 мл кипящей воды, прибавляют 250 мг салициловой кислоты, кипятят в течение 3 мин и немедленно охлаждают.

Срок годности от 2 до 3 недель при хранении раствора при температуре от 4 до 10 °С.

Свежий раствор крахмала готовят в том случае, когда в точке эквивалентности переход окраски от синей к бесцветной не резкий.

Испытание на чувствительность. К 2 мл 0,5 % раствора крахмала прибавляют 20 мл воды, около 50 мг калия йодида и 0,05 мл 0,005 М раствора йода; полученный раствор должен иметь синее окрашивание.

Крахмала раствор 0,5 %, содержащий 0,2 % сульфаминовой кислоты.

1 г крахмала растворимого смешивают с 10 мл воды до получения однородной кашицы и смесь медленно вливают при постоянном перемешивании в 200 мл кипящей воды. Прибавляют 400 мг сульфаминовой кислоты и продолжают кипячение еще в течение 2 мин. Используют свежеприготовленным.

Крахмала раствор 0,1 %.

0,1 г крахмала растворимого растирают в 5 мл воды и, продолжая перемешивать, прибавляют к 100 мл кипящей воды и кипятят ещё 2 мин, охлаждают.

Крахмала раствор с калия йодидом.

0,75 г калия йодида растворяют в 100 мл воды, нагревают до кипения и прибавляют при перемешивании раствор 0,5 г крахмала растворимого в 35 мл воды. Кипятят в течение 2 мин и охлаждают.

Испытание на чувствительность. Смесь, состоящая из 15 мл раствора крахмала с калия йодидом, 0,05 мл уксусной кислоты ледяной и 0,3 мл 0,0005 М раствора йода, должна иметь синее окрашивание.

Йодкрахмальная бумага. Обеззоленные бумажные фильтры пропитывают раствором крахмала с калия йодидом и сушат в темном помещении на воздухе, не содержащем паров кислот. Бумагу разрезают на полоски длиной около 50 мм и шириной около 6 мм. Полоска йодкрахмальной бумаги не должна тотчас синеть при смачивании ее 1 каплей 0,1 М раствора хлористоводородной кислоты.

Йодкрахмальную бумагу хранят в банках оранжевого стекла с притертой пробкой в защищенном от света месте.

Крезол. [95-48-7]. C_7H_8O. (М.м. 108,14). 2-Метилфенол.

Кристаллы или переохлажденная жидкость, темнеющая на свету и воздухе. Смешивается с этанолом и эфиром, растворим примерно в 50 частях воды и растворах гидроксидов щелочных металлов.

d_{20}^{20}. Около 1,05.

n_D^{20}. От 1,540 до 1,550.

Температура кипения. Около 190 °С.

Температура затвердевания. Не ниже 30,5 °С.

Остаток после выпаривания. Не более 0,1 % (м/м). Выпаривают при температуре 100 °С, сушат при температуре от 100 до 105 °С.

Хранят в защищенном от воздействия кислорода и влаги месте, перед использованием перегоняют.

***м*-Крезол**. [108-39-4]. C_7H_8O. (М.м. 108,14). 3-Метилфенол.

Бесцветная или желтоватая жидкость.

Умеренно растворим в воде, смешивается со спиртом 96 % и дихлорметаном.

d_{20}^{20} Около 1,03.

Температура кипения. Около 202 °С.

Температура плавления. 11 – 12 °С.

***п*-Крезол**. [106-44-5]. C_7H_8O. (М.м. 108,14). 4-Метилфенол.

Бесцветные или белые или практически белые кристаллы или кристаллическая масса.

d_{20}^{20}. Около 1,02.

Температура кипения. 201,9 °С.

Температура плавления. 35,5 °С.

Крезоловый красный. [1733-12-6]. $C_{21}H_{18}O_5S$. (М.м. 382,43).

3,3-Бис(4-гидрокси-3-метилфенил)-3*H*-2,1λ^6-бензоксатиол-1,1-дион.

Кристаллический порошок красновато-коричневого цвета.

Мало растворим в воде, растворим в спирте 96 % и разведённых растворах гидроксидов щелочных металлов.

Крезолового красного раствор 0,1 %.

0,1 г крезолового красного растворяют в смеси 2,65 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида и 20 мл спирта 96 %, доводят объём раствора водой до 100 мл.

Испытание на чувствительность. К 100 мл воды, свободной от углерода диоксида, прибавляют 0,1 мл раствора крезолового красного и 0,15 мл 0,02 М раствора натрия гидроксида; появляется пурпурно-красное окрашивание, которое должно перейти в желтое при прибавлении не более 0,15 мл 0,02 М раствора хлористоводородной кислоты.

Изменение окраски от желтой до красной в интервале pH 7,0 – 8,6.

Крезолового красного раствор 0,04 %.

0,1 г крезолового красного растворяют в 13,1 мл 0,02 М раствора натрия гидроксида и доводят объём раствора свежепрокипяченной и охлажденной водой до 250,0 мл.

Переход окраски раствора от красной к желтой в интервале pH 0,2 – 1,8 и от желтой к пурпурно-красной в интервале pH 7,2 – 8,8.

Крезолового красного спиртовой раствор 0,1 %.

0,1 г крезолового красного растворяют в 50 мл спирта 96 % и доводят объём раствора водой до 100,0 мл.

Крезоловый красный водорастворимый. [62625-29-0]. $C_{21}H_{17}NaO_5S$. (М.м. 404,4).

2-[(4-Гидрокси-3-метилфенил)(3-метил-4-оксоциклогекса-2,5-диен-1-ил)метил]бензолсульфонат натрия.

Натриевая соль *о*-крезолсульфофталеина. (Взамен аммониевой соли).

Порошок красно-коричневого цвета. Растворим в воде.

Переход окраски раствора от красной к желтой в интервале pH 0,2 – 1,8 и от желтой к красной в интервале pH 7,2 – 8,8.

Раствор индикатора. 0,04 % раствор.

Крезоловый пурпурный. [2303-01-7]. $C_{21}H_{18}O_5S$. (М.м. 382,43).

3,3-Бис(4-гидрокси-2-метилфенил)-3*H*-2,1λ^6-бензоксатиол-1,1-дион.

Кристаллический порошок оливково-зеленого цвета.

Мало растворим в воде, растворим в спирте 96 %, уксусной кислоте ледяной и метаноле.

Крезолового пурпурного раствор 0,1 %.

0,1 г крезолового пурпурного растворяют в 13 мл 0,01 М раствора натрия гидроксида и доводят объём раствора водой до 100,0 мл.

Переход окраски от красной до желтой в интервале pH 1,2 – 2,8 и от желтой до фиолетовой в интервале pH 7,4 – 9,0.

Крезолового пурпурного раствор 0,04 %.

0,1 г крезолового пурпурного растворяют в 13,1 мл 0,02 М раствора натрия гидроксида и доводят объём раствора свежепрокипяченной и охлажденной водой до 250,0 мл.

Переход окраски от розово-красной к желтой в интервале pH 1,2 – 2,8 и от желтой к фиолетовой в интервале pH 7,4 – 9,0.

Крезолового пурпурного спиртовой раствор 0,1 %.

0,1 г крезолового пурпурного растворяют в 50 мл спирта 96 % и доводят объём раствора водой до 100,0 мл.

Крезоловый пурпурный водорастворимый. [62625-31-4]. $C_{21}H_{17}NaO_5S$. (М.м. 404,4).

2-[(4-Гидрокси-2-метилфенил)(2-метил-4-оксоциклогекса-2,5-диен-1-ил)метил]бензолсульфонат натрия.

Мелкокристаллический порошок от оранжево-коричневого до черного цвета.

Переход окраски раствора от розово-красной к желтой в интервале pH 1,2 – 2,8 и от желтой к пурпурной в интервале pH 7,4 – 9,0.

Раствор индикатора. 0,04 % раствор.

Кремневольфрамовая кислота. [11130-20-4]. $H_4[SiW_{12}O_{40}]\cdot xH_2O$. (М.м. 2878,2, для безводного).

Кристаллы белого или желтовато-белого цвета, расплывающиеся на воздухе.

Очень легко растворима в воде и спирте 96 %.

Хранят в воздухонепроницаемой упаковке.

Кремневольфрамовой кислоты раствор 1 %.

1 г кремневольфрамовой кислоты растворяют в воде и доводят объём раствора водой до 100,0 мл.

Кристаллический фиолетовый. [548-62-9]. $C_{25}H_{30}ClN_3$. (М.м. 408,0).

4-{Бис[4-(диметиламино)фенил]метилен}-*N*,*N*-диметилциклогекса-2,5-диен-1-иминий хлорид.

Кристаллы или порошок темно-зеленого цвета.

Растворим в воде, спирте 96 %.

Кристаллического фиолетового раствор 0,5 %.

0,5 г кристаллического фиолетового растворяют в уксусной кислоте безводной и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл.

Испытание на чувствительность. К 50 мл кислоты уксусной безводной прибавляют 0,1 мл раствора кристаллического фиолетового; появляется голубовато-фиолетовое окрашивание, которое переходит в голубовато-зеленое при прибавлении 0,1 мл 0,1 М раствора хлорной кислоты.

Кристаллического фиолетового раствор 0,1 %. 0,1 г кристаллического фиолетового растворяют в уксусной кислоте безводной и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл.

Переход окраски при неводном титровании от фиолетовой (щелочная) через сине-зеленую (нейтральная) к зеленовато-желтой (кислая).

Ксантгидрол. [90-46-0]. $C_{13}H_{10}O_2$. (М.м. 198,22).

9*H*-Ксантен-9-ол.

Содержит не менее 90,0 % $C_{13}H_{10}O_2$.

Порошок от белого до светло-желтого цвета.

Очень мало растворим в воде, растворим в спирте 96 %, эфире и уксусной кислоте ледяной.

Доступен также в виде раствора, содержащего от 90 до 110 г/л ксантгидрола в метаноле.

Температура плавления. Около 123 °С.

Хранят в защищенном от света месте. Если используют метанольный раствор, то хранят в небольших герметично закрытых ампулах и при необходимости перед использованием фильтруют.

Ксантгидрол особой чистоты.

Должен выдерживать требования для ксантгидрола и следующее дополнительное требование.

Содержит не менее 98,0 % $C_{13}H_{10}O_2$.

Ксантгидрола раствор. К 100 мл уксусной кислоты безводной прибавляют 0,1 мл 10 % раствора ксантгидрола в метаноле, 1 мл хлористоводородной кислоты концентрированной и выдерживают в течение 24 ч.

Ксантгидроловый реактив. См. **Ксантгидрола раствор**.

Ксиленоловый оранжевый. [3618-43-7]. $C_{31}H_{28}N_2Na_4O_{13}S$. (М.м. 760,6).

2,2',2",2"'-{(1,1-Диоксо-3*H*-2,1λ^6-бензоксатиол-3,3-диил)бис[(6-гидрокси-5-метил-3,1-фенилен)метиленнитрило]}тетраацетат тетранатрия.

Кристаллический порошок красновато-коричневатого цвета.

Растворим в воде, практически нерастворим в спирте 96 % и эфире.

В интервале pH 5,0 – 6,0 ксиленоловый оранжевый окрашен в лимонно-желтый цвет, а его комплекс с ионом висмута в тех же условиях красного цвета. В щелочных растворах индикатор имеет фиолетово-красную окраску. Переход окраски при прямом комплексонометрическом титровании от красной в лимонно-желтую.

Ксиленолового оранжевого индикаторная смесь.

Растирают в порошок 1 часть ксиленолового оранжевого с 99 частями калия нитрата или натрия хлорида.

Испытание на чувствительность. К 50 мл воды прибавляют 1 мл уксусной кислоты разведённой 12 %, 50 мг индикаторной смеси ксиленолового оранжевого и 0,05 мл 3,3 % раствора свинца(II) нитрата. Прибавляют гексаметилентетрамин до тех пор, пока окраска раствора не изменится от желтой до фиолетово-красной; после прибавления 0,1 мл 0,1 М раствора натрия эдетата окраска раствора должна измениться на желтую.

Ксиленолового оранжевого раствор.

0,1 % раствор. Переход окраски см. «Ксиленоловый оранжевый».

Срок годности 14 сут.

2,3-Ксилидин. См. **2,3-Диметиланилин**.

2,6-Ксилидин. См. **2,6-Диметиланилин**.

Ксилоза. [58-86-6]. $C_5H_{10}O_5$. (М.м. 150,13). D-Ксилопиранза.

Кристаллический порошок белого цвета или бесцветные игольчатые кристаллы.

Очень легко растворима в воде, растворима в горячем спирте 96 %.

$[\alpha]_D^{20}$. Около + 20° (10 % раствор через 10 ч после его приготовления).

Ксилол. [1330-20-7]. C_8H_{10}. (М.м. 106,17).

Диметилбензол.

Смесь *о*-, *м*- и *п*-изомеров.

Прозрачная, бесцветная, воспламеняющаяся жидкость.

Практически нерастворим в воде, смешивается со спиртом 96 % и эфиром.

d_{20}^{20}. Около 0,867.

n_D^{20}. Около 1,497.

Температура кипения. Около 138 °С.

***о*-Ксилол**. [95-47-6]. C_8H_{10}. (М.м. 106,17).

1,2-Диметилбензол.

Прозрачная, бесцветная, воспламеняющаяся жидкость.

Практически нерастворим в воде, смешивается со спиртом 96 % и эфиром.

d_{20}^{20}. Около 0,881.

n_D^{20}. Около 1,505.

Температура кипения. Около 144 °С.

Температура плавления. Около -25 °С.

***м*-Ксилол**. [108-38-3]. C_8H_{10}. (М.м. 106,17).

1,3-Диметилбензол.

Прозрачная, бесцветная, воспламеняющаяся жидкость.

Практически нерастворим в воде, смешивается со спиртом 96 % и эфиром.

d_{20}^{20}. Около 0,884.

n_D^{20}. Около 1,497.

Температура кипения. Около 139 °С.

Температура плавления. Около -47 °С.

Кумарин. [91-64-5]. $C_9H_6O_2$. (М.м. 146,14). 2*H*-Хромен-2-он

2*H*-1-Бензопиран-2-он.

Бесцветный кристаллический порошок или ромбические или прямоугольные кристаллы.

Очень легко растворим в кипящей воде, растворим в спирте 96 % и в растворах гидроксидов щелочных металлов.

Температура кипения. Около 302 °С.

Температура плавления. От 68 до 71 °С.

Кумасси бриллиантовый синий G. См. **Кислотный синий 92**.

Кумасси бриллиантовый синий Р250. См. **Кислотный синий 83**.

Кумасси синего раствор. См. **Кислотного синего 92 раствор**.

Куркумин. [458-37-7]. $C_{21}H_{20}O_6$. (М.м. 368,38).

(1*E*,6*E*)-1,7-Бис(4-гидрокси-3-метоксифенил)гепта-1,6-диен-3,5-дион.

Кристаллический порошок оранжево-коричневого цвета.

Практически нерастворим в воде, растворим в уксусной кислоте ледяной, практически нерастворим в эфире.

Температура плавления. Около 183 °С.

Куркумовая бумага. Бумага должна быть равномерно окрашена в ярко-желтый цвет.

Переход окраски бумаги от желтой к буро-красной в интервале pH 7,4 – 9,2 и от буро-красной к оранжево-желтой в интервале pH 10,2 – 11,8.

Срок годности 2 года.

Лавандулол. [498-16-8]. $C_{10}H_{18}O$. (М.м. 154,25).

(2*R*)-5-Метил-2-(проп-1-ен-2-ил)гекс-4-ен-1-ол.

Маслянистая жидкость с характерным запахом.

d_{20}^{20}. Около 0,875.

n_D^{20}. Около 1,407.

$[\alpha]_D^{20}$. Около минус 10,2 ºС.

Хроматографическая чистота лавандолола, используемого в газовой хроматографии, должна быть не менее 98,0 %.

Лавандулола ацетат. [25905-14-0]. $C_{12}H_{20}O_2$. (М.м. 196,29).

[(2*R*)-5-Метил-2-(проп-1-ен-2-ил)гекс-4-ен-1-ил]ацетат.

Бесцветная жидкость с характерным запахом.

d_{20}^{20}. Около 0,911.

n_D^{20}. Около 1,454.

Хроматографическая чистота лавандолола ацетата, используемого в газовой хроматографии, должна быть не менее 93,0 %.

Лакмоид. [33869-21-5]. $C_{24}H_{16}N_2O_6$. (М.м. 428,39).

7-Амино-2,8-бис(2,4-дигидроксифенил)-3*H*-феноксазин-3-он.

Порошок черно-фиолетового цвета.

Растворим в воде, спирте 96 %, ацетоне, уксусной кислоте ледяной.

Переход окраски раствора от красной к синей в интервале pH 4,4 – 6,4.

Раствор индикатора. 0,2 % раствор в спирте 96 %. Растворение проводят при нагревании.

Лакмоидная бумага синяя.

Бумага должна быть равномерно окрашена в серо-голубой цвет.

Переход окраски бумаги от бледно-фиолетовой к сероголубой в интервале pH 4,0 – 6,4.

Срок годности 2 года.

Лакмус. [1393-92-6].

Пигмент сине-фиолетового цвета, полученный из различных видов *Rocella*, *Lecanora* или других лишайников.

Растворим в воде, практически нерастворим в спирте 96 %.

Переход окраски от красной до синей в интервале pH 5,0 – 8,0.

Лакмусовая бумага синяя.

10 частей грубо измельченного лакмуса кипятят с 100 частями спирта 96 % в течение 1 ч. Спирт декантируют, к остатку прибавляют смесь из 45 частей спирта 96 % и 55 частей воды. Через 2 дня прозрачную жидкость декантируют, пропитывают полоски фильтровальной бумаги и сушат.

Испытание на чувствительность. Полоску фильтровальной бумаги размером 10 × 60 мм погружают в смесь 10 мл 0,02 М раствора хлористоводородной кислоты и 90 мл воды. При встряхивании бумага должна приобрести красное окрашивание в течение 45 с.

Лакмусовая бумага красная.

К синему экстракту лакмуса прибавляют по каплям хлористоводородную кислоту разведённую 7,3 % до перехода синей окраски в красную. Полоски фильтровальной бумаги пропитывают полученным раствором и сушат.

Испытание на чувствительность. Полоску фильтровальной бумаги размером 10 × 60 мм погружают в смесь 10 мл 0,02 М раствора натрия

гидроксида и 90 мл воды. При встряхивании бумага должна приобрести синее окрашивание в течение 45 с.

Лактобионовая кислота. [96-82-2]. $C_{12}H_{22}O_{12}$. (М.м. 358,30).

4-*O*-β-D-Галактопиранозил-D-глюконовая кислота.

Кристаллический порошок белого цвета.

Легко растворима в воде, практически нерастворима в спирте 96 %.

Температура плавления. Около 115 °С.

Лантана(III) нитрат. [10277-43-7]. $La(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$. (М.м. 433,0).

Нитрат лантана(III), гексагидрат.

Бесцветные кристаллы, расплывающиеся на воздухе.

Легко растворим в воде.

Хранят в воздухонепроницаемой упаковке.

Лантана(III) нитрата раствор 5 %.

5,0 г лантана(III) нитрата растворяют в воде и доводят объём раствора водой до 100 мл.

Лантана(III) нитрата раствор 0,0005 М.

0,2166 г лантана(III) нитрат помещают в мерную колбу вместимостью 1 л, растворяют в 300 мл воды для хроматографии, прибавляют 1,0 мл азотной кислоты разведённой 4 % и доводят объём раствора водой для хроматографии до метки.

Лантана(III) оксид. [1312-81-8]. La_2O_3. (М.м. 325,81). Оксид лантана(III).

Аморфный порошок почти белого цвета. Поглощает углерода диоксид из воздуха.

Практически нерастворим в воде, растворим в разведённых минеральных кислотах.

Кальций. Не более 5 ppm.

Лантана(III) хлорида раствор.

К 58,65 г лантана(III) оксида медленно прибавляют 100 мл хлористоводородной кислоты концентрированной, нагревают до кипения, охлаждают и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл.

Лауриловый спирт. [112-53-8]. $C_{12}H_{26}O$. (М.м. 186,33). Додекан-1-ол.

d_{20}^{20}. Около 0,820.

Температура кипения. От 24 до 27 °С.

Левоментол. [98167-53-4]. $C_{10}H_{20}O$. (М.м. 156,27).

(1*R*,2*S*,5*R*)-5-Метил-2-(пропан-2-ил)циклогексанол.

Бесцветные кристаллы или кристаллический порошок с сильным запахом мяты перечной.

Очень легко растворим в спирте 96 %, эфире, уксусной кислоте, легко растворим в жидком парафине и жирных маслах, очень мало растворим в воде.

Лейцин. [61-90-5]. $C_6H_{13}NO_2$. (М.м. 131,17). L-Лейцин

(2*S*)-2-Амино-4-метилпентановая кислота.

Белый или почти белый кристаллический порошок или блестящие хлопья.

Умеренно растворим в воде, практически нерастворим в спирте.

Лимонен. [5989-27-5]. $C_{10}H_{16}$. (М.м. 136,23).

(4*R*)-1-Метил-4-(пропен-2-ил)циклогекс-1-ен.

Бесцветная жидкость.

Практически нерастворим в воде, растворим в спирте 96 %.

d_{20}^{20}. Около 0,84.

n_D^{20}. От 1,471 до 1,474.

$[\alpha]_D^{20}$. От + 96 до + 106°.

Температура кипения. От 175 до 177 °С.

Хроматографическая чистота лимонена, используемого в газовой хроматографии, должна быть не менее 99,0 %.

Лимонная кислота. [5949-29-1]. $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$. (М.м. 210,14).

2-Гидроксипропан-1,2,3-трикарбоновая кислота, моногидрат.

Бесцветные прозрачные кристаллы или белый кристаллический порошок. Очень легко растворима в воде, легко растворима в спирте 96 %, умеренно растворима в эфире.

При использовании в испытании на железо лимонная кислота должна выдерживать следующее дополнительное испытание.

0,5 г лимонной кислоты растворяют в 10 мл воды, прибавляют 0,1 мл тиогликолевой кислоты, перемешивают, прибавляют раствор аммиака концентрированный до щелочной реакции и доводят объём полученного раствора водой до 20 мл. Раствор не должен окрашиваться в розовый цвет.

Лимонная кислота безводная. [77-92-9]. $C_6H_8O_7$. (М.м. 192,12).

2-Гидроксипропан-1,2,3-трикарбоновая кислота.

Белый кристаллический порошок, бесцветные кристаллы или гранулы.

Очень легко растворима в воде, легко растворима в спирте 96 %, умеренно растворима в эфире.

Температура плавления. Около 153 °С с разложением.

Лимонной кислоты раствор 0,1 М.

21,014 г лимонной кислоты (или 19,212 г лимонной кислоты безводной) растворяют в достаточном количестве воды и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл.

Линалила ацетат. [115-95-7]. $C_{12}H_{20}O_2$. (М.м. 196,28).

[(3*RS*)-3,7-Диметилокта-1,6-диен-3-ил]ацетат.

Бесцветная или слегка желтая жидкость с сильным запахом бергамота и лаванды.

d_{25}^{25}. От 0,895 до 0,912.

n_D^{20}. От 1,448 до 1,451.

Температура кипения. Около 215 °С.

Хроматографическая чистота линалила ацетата, используемого в газовой хроматографии, должна быть не менее 95,0 %.

Линалол. [78-70-6]. $C_{10}H_{18}O$. (М.м. 154,25).

(3*RS*)-3,7-Диметилокта-1,6-диен-3-ол.

Смесь 2 стереоизомеров (ликареола и кориандрола).

Жидкость. Практически нерастворим в воде, растворим в эфире.

d_{20}^{20}. Около 0,860.

n_D^{20}. Около 1,462.

Температура кипения. Около 200 °С.

Хроматографическая чистота линалола, используемого в газовой хроматографии, должна быть не менее 96,0 %.

Линдан. [58-89-9]. $C_6H_6Cl_6$. (М.м. 290,83).

(1*R*,2*S*,3*r*,4*R*,5*S*,6*r*)-1,2,3,4,5,6-Гексахлорциклогексан..

Твердый белый порошок.

Мало растворим в воде, растворим в органических растворителях.

Температура кипения. 323 °С.

Температура плавления. 112,8 °С.

Литий. [7439-93-2]. Li. (А.м. 6,941). Литий.

Мягкий металл, на свежем срезе серебристо-серого цвета, при контакте с воздухом быстро становится тусклым. Бурно реагирует с водой с образованием водорода и раствора лития гидроксида.

Растворим в метаноле с образованием водорода и раствора лития метоксида; практически нерастворим в эфире и петролейном эфире.

Хранят под петролейным эфиром или жидким парафином.

Лития гидроксид. [1310-66-3]. $LiOH \cdot H_2O$. (М.м. 41,96). Гидроксид лития, моногидрат. Гранулированный порошок белого цвета. Является сильной щелочью, быстро поглощает воду и углерода диоксид.

Растворим в воде, умеренно растворим в спирте 96 %.

Хранят в воздухонепроницаемой упаковке.

Лития карбонат. [554-13-2]. Li_2CO_3.(М.м. 73,89). Карбонат лития.

Легкий порошок белого цвета.

Умеренно растворим в воде, очень мало растворим в спирте 96 %. Насыщенный раствор при температуре 20 °С содержит около 13 г/л Li_2CO_3.

Лития метаборат безводный. [13453-69-5]. $LiBO_2$. (М.м. 49,75). Метаборат лития. Белые триклинные кристаллы.

Мало растворим в холодной воде, легко растворим в горячей воде.

Температура плавления. Около 840 °С.

Лития сульфат. [10102-25-7]. $Li_2SO_4 \cdot H_2O$. (М.м. 127,96). Сульфат дилития, моногидрат.

Бесцветные кристаллы или белый кристаллический порошок.

Легко растворим в воде, практически нерастворим в спирте 96 %.

Лития хлорид. [7447-41-8]. LiCl. (М.м. 42,39). Хлорид лития.

Кристаллический порошок или гранулы, или кубические кристаллы; расплывается на воздухе.

Легко растворим в воде, растворим в ацетоне и спирте 96 %. Водные растворы имеют нейтральную или слабощелочную реакцию.

Хранят в воздухонепроницаемой упаковке.

Люголя раствор.

1 г йода и 2 г калия йодида растворяют в 17 мл воды и хорошо перемешивают.

Магнезиальная смесь.

5 г магния хлорида и 7 г аммония хлорида растворяют в воде, прибавляют 35 мл 10 % раствора аммиака и воды до 100 мл. Отстаивают в течение 3 – 5 сут и фильтруют.

Магнезон ХС. $C_{16}H_{10}ClN_2NaO_5S \cdot H_2O$. (М.м. 418,8).

2-Гидрокси-3-[(2-гидроксинафталин-1-ил)диазенил]-5-хлорбензолсульфонат натрия, моногидрат.

Порошок красно-коричневого цвета.

Мало растворим в воде, спирте 96 % и ацетоне, практически нерастворим в хлороформе и эфире.

В интервале pH 9,8 – 11,2 имеет сине-фиолетовую окраску, а его комплекс с ионом магния в тех же условиях ярко-красного цвета.

Переход окраски при прямом титровании иона магния от ярко-красной к сине-фиолетовой.

Раствор индикатора. 0,01 % раствор в ацетоне.

Срок годности раствора 2 мес.

Магний. [7439-95-4]. Mg. (А.м. 24,31). Магний.

Лента или стружка, или проволока серебристо-белого цвета, или порошок серого цвета.

Реагирует с кислотами, растворим в солях аммония, практически нерастворим в разведённых растворах гидроксидов щелочных металлов.

Магния ацетат. [16674-78-5]. $C_4H_6MgO_4 \cdot 4H_2O$. (М.м. 214,45).

Ацетат магния, тетрагидрат.

Бесцветные кристаллы, расплывающиеся на воздухе. Легко растворим в воде и спирте 96 %.

Хранят в воздухонепроницаемой упаковке.

Магния ацетата раствор спиртовой 0,5 %. 0,5 г магния ацетата растворяют в спирте 96 %, доводят объём раствора тем же спиртом до 100 мл и перемешивают. Срок годности раствора не более 2 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Магния нитрат. [13446-18-9]. $Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$. (М.м. 256,41).

Нитрат магния, гексагидрат.

Бесцветные прозрачные кристаллы, расплывающиеся на воздухе.

Очень легко растворим в воде, легко растворим в спирте 96 %.

Хранят в воздухонепроницаемой упаковке.

Магния нитрата раствор.

17,3 г магния нитрата растворяют при осторожном нагревании в 5 мл воды, прибавляют 80 мл спирта 96 %, охлаждают и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл.

Магния оксид. [1309-48-4]. MgO. (М.м. 40,30). Оксид магния.

Белый, мелкий легкий порошок без запаха.

Практически нерастворим в воде, с которой дает щелочную реакцию на фенолфталеин, растворим в разведённых кислотах с легким шипением.

Магния сульфат безводный. [7487-88-9]. $MgSO_4$. (М.м. 120,37). Сульфат магния.

Белый мелкокристаллический порошок.

Очень легко растворим в воде, гигроскопичен.

Магния сульфат гептагидрат. [10034-99-8]. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$. (М.м. 246,47).

Сульфат магния, гептагидрат.

Бесцветные призматические кристаллы, выветривающиеся на воздухе.

Легко растворим в воде, очень легко растворим в горячей воде; практически нерастворим в спирте 96 %.

Магния сульфата насыщенный раствор.

100 г магния сульфата заливают 100 мл воды и выдерживают в течение 24 ч при частом взбалтывании. Раствор фильтруют.

Магния сульфата раствор 10 %.

10 г магния сульфата растворяют в воде и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл.

Магния сульфата аммиачный раствор.

10 г магния сульфата безводного и 20 г аммония хлорида растворяют в 85 мл воды, прибавляют 37 мл 5 % раствора аммиака и перемешивают. Полученную смесь выдерживают 4±1 суток в плотно закрытой ёмкости, декантируют и фильтруют.

Магния хлорид. [7791-18-6]. $MgCl_2 \cdot 6H_2O$. (М.м. 203,30).

Хлорид магния, гексагидрат.

Белые кристаллы, на воздухе расплываются.

Очень легко растворим в воде, легко растворим в спирте 96 %.

Магния хлорида раствор 10 %.

10 г магния хлорида растворяют в воде и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл.

Магния перхлорат. [10034-81-8]. $Mg(ClO_4)_2$. (М.м. 223,21).

Перхлорат магния.

Гранулы белого цвета. Препарат чрезвычайно притягивает влагу, при нагревании с органическими веществами может дать взрыв.

Легко растворим в воде, очень легко растворим в горячей воде, растворим в спирте 96 %, метаноле, ацетоне.

Макрогол 200. [25322-68-3]. α-Гидро-ω-гидроксиполи(оксиэтан-1,2-диил).

Прозрачная, бесцветная или почти бесцветная, вязкая жидкость.

Легко растворим в воде, ацетоне, спирте 96 % и метиленхлориде, практически нерастворим в эфире и жирных маслах.

d_{20}^{20}. Около 1,127.

n_D^{20}. Около 1,450.

Макрогол 200 очищенный.

500 мл макрогола 200 помещают в круглодонную колбу вместимостью 1000 мл, отгоняют летучие вещества при температуре 60 °С в течение 6 ч, используя ротационный испаритель и вакуум от 1,5 до 2,5 кПа.

Макрогол 300. [25322-68-3]. α-Гидро-ω-гидроксиполи(оксиэтан-1,2-диил).

Макрогол 400. [25322-68-3]. α-Гидро-ω-гидроксиполи(оксиэтан-1,2-диил).

Макрогола 400 раствор спиртовой 5 %. 5 мл макрогола 400 смешивают со 100 мл спирта 96 %. Срок годности раствора не более 6 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Макрогол 1000. [25322-68-3]. α-Гидро-ω-гидроксиполи(оксиэтан-1,2-диил).

Макрогол 1500. [25322-68-3]. α-Гидро-ω-гидроксиполи(оксиэтан-1,2-диил).

Макрогол 20000. α-Гидро-ω-гидроксиполи(оксиэтан-1,2-диил).

Макрогол 20000 2-нитротерефталат. Поли[(оксиэтан-1,2-диил)-*со*-(2-нитротерефталоил)]

Макрогол 20000, модифицированный обработкой 2-нитротерефталевой кислотой.

Твердая воскообразная масса белого или почти белого цвета.

Растворим в ацетоне.

Малатион. [121-75-5]. $C_{10}H_{19}O_6PS_2$. (М.м. 330,36).

Диэтил(2-{[бис(метокси)фосфоротионил]сульфанил}бутандиоат).

Температура кипения. Около 156 °С.

Малахитовый зеленый. [569-64-2]. $C_{23}H_{25}ClN_2$. (М.м. 364,91).

4-{[4-(Диметиламино)фенил](фенил)метилен}-*N*,*N*-диметилциклогекса-2,5-диен-1-иминий хлорид.

Кристаллы зеленого цвета с металлическим блеском.

Очень легко растворим в воде с образованием раствора синевато-зеленого цвета, растворим в спирте 96 % и метаноле.

Раствор 0,01 г/л в спирте 96 % имеет максимум поглощения при длине волны 617 нм.

Малахитового зеленого раствор 0,5 %. Раствор 5 г/л в уксусной кислоте безводной.

Малахитового зеленого спиртовой раствор 0,1 %.

0,1 г малахитового зеленого растворяют в 20 мл спирта 96 % и доводят объём раствора водой до 100,0 мл.

Малеиновая кислота. [110-16-7]. $C_4H_4O_4$. (М.м. 116,07).

(2*Z*)-Бут-2-ендиовая кислота.

Содержит не менее 99,0 % $C_4H_4O_4$.

Белый кристаллический порошок.

Легко растворим в воде и спирте 96 %, умеренно растворим в эфире.

Малеиновый ангидрид. [108-31-6]. $C_4H_2O_3$. (М.м. 98,06).

Фуран-2,5-дион.

Кристаллы белого цвета.

Растворим в воде с образованием малеиновой кислоты, очень легко растворим в ацетоне и этилацетате, легко растворим в толуоле, растворим в спирте 96 % с образованием сложного эфира, очень мало растворим в петролейном эфире.

Температура плавления. Около 52 °С.

Любой остаток, не растворимый в толуоле, не должен превышать 5 % (малеиновая кислота).

Малеинового ангидрида раствор 5 %.

5 г малеинового ангидрида растворяют в толуоле и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл.

Срок годности 1 мес. Раствор в случае помутнения фильтруют.

Маннит. [69-65-8]. $C_6H_{14}O_6$. (М.м. 182,17). D-Маннит.

Белый или почти белый кристаллический порошок, легкие гранулы.

Легко растворим в воде, очень мало растворим в спирте 96 %.

Манноза. [3458-28-4]. $C_6H_{12}O_6$. (М.м. 180,16). D-Маннопираноза.

Кристаллический или мелкокристаллический порошок белого цвета.

Очень легко растворима в воде, мало растворима в этаноле.

$[\alpha]_D^{20}$. От + 13,7° до + 14,7° (20 % раствор в воде, содержащей около 0,05 % NH_3).

Температура плавления. Около 132 °С с разложением.

Марганца(IV) оксид. [1313-13-9]. MnO_2 (М.м. 86,94). Оксид марганца(IV).

Темно-коричневый порошок.

Нерастворим в воде, азотной кислоте и ацетоне. Реагирует в хлористоводородной кислоте.

Марганца(II) сульфат. [10034-96-5]. $MnSO_4 \cdot H_2O$. (М.м. 169,02). Сульфат марганца(II), моногидрат.

Кристаллический порошок или кристаллы бледно-розового цвета.

Легко растворим в воде, практически нерастворим в спирте 96 %.

Потеря в массе после прокаливания. От 10,0 % до 12,0 %. Определение проводят из 1,000 г при температуре 500 °С.

Масляная кислота. [107-92-6]. $C_4H_8O_2$. (М.м. 88,11).

Бутановая кислота.

Содержит не менее 99,0 % $C_4H_8O_2$.

Маслянистая жидкость. Смешивается с водой, спиртом 96 %.

d_{20}^{20}. Около 0,96.

n_D^{20}. Около 1,398.

Температура кипения. Около 163 °С.

Меди(II) ацетат. [6046-93-1]. $C_4H_6CuO_4 \cdot H_2O$. (М.м. 199,65).

Ацетат меди(II), моногидрат.

Кристаллы или порошок голубовато-зеленого цвета.

Легко растворим в кипящей воде, растворим в воде и спирте 96 %, мало растворим в эфире и глицерине 85 %.

Меди(II) ацетата раствор 5 %.

5,0 г меди(II) ацетата растворяют в воде, подкисленной несколькими миллилитрами уксусной кислоты, и доводят объём раствора водой до 100,0 мл.

Меди(II) нитрат. [10031-43-3]. $Cu(NO_3)_2 \cdot 3H_2O$. (М.м. 241,62). Нитрат меди(II), тригидрат.

Кристаллы синего цвета.

Очень легко растворим в воде, спирте 96 % и кислоте азотной разведённой. Водный раствор имеет сильно кислую реакцию.

Хранят в воздухонепроницаемой упаковке.

Меди(II) нитрата раствор 5 %. 5,0 г меди(II) нитрата растворяют в воде и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл.

Меди(II) сульфат. [7758-99-8]. $CuSO_4 \cdot 5H_2O$. (М.м. 249,69). Сульфат меди(II), пентагидрат.

Порошок или кристаллы синего цвета. Медленно выветривается на воздухе. Очень легко растворим в воде, мало растворим в спирте 96 %.

Меди(II) сульфата раствор 12,5 %. 12,5 г меди(II) сульфата растворяют в воде и доводят объём раствора водой до 100 мл.

Меди(II) сульфата раствор 10 %. 10,0 г меди(II) сульфата растворяют в воде и доводят объём раствора водой до 100 мл.

Меди(II) сульфата раствор 5 %. 5,0 г меди(II) сульфата растворяют в воде и доводят объём раствора водой до 100 мл.

Меди(II) сульфата раствор 1,25 %. 1,25 г меди(II) сульфата помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в воде и доводят объём раствора водой до метки.

Меди тетрааммиаката аммиачный раствор.

34,5 г меди(II) сульфата растворяют в 100 мл воды, прибавляют при перемешивании по каплям раствор аммиака концентрированный до

растворения образовавшегося осадка. Поддерживая температуру ниже 20 °С, при непрерывном встряхивании прибавляют по каплям 30 мл 20 % раствора натрия гидроксида. Фильтруют через стеклянный фильтр (40), промывают водой до получения прозрачного фильтрата. Встряхивают с 200 мл раствора аммиака концентрированного и фильтруют через стеклянный фильтр, затем повторно фильтруют, чтобы уменьшить осадок до минимума.

Меди(I) хлорид. [7758-89-6]. CuCl (М.м. 99,00). Хлорид меди(I).

Серовато-белый или серовато-зеленый порошок.

Практически нерастворим в воде, растворим в хлористоводородной кислоте концентрированной и растворе аммиака концентрированном.

Меди(I) хлорида раствор.

К 1,25 г меди(I) хлорида прибавляют 1 г натрия метабисульфита и 100 мл 10 % раствора аммония хлорида.

Меди(II) хлорид. [10125-13-0]. $CuCl_2 \cdot 2H_2O$. (М.м. 170,48).

Хлорид меди(II), дигидрат.

Порошок или кристаллы зеленовато-голубого цвета, расплывающиеся на воздухе, выветриваются в сухом воздухе.

Легко растворим в воде, спирте 96 % и метаноле, умеренно растворим в ацетоне, мало растворим в эфире.

Хранят в воздухонепроницаемой упаковке.

Меди(II) хлорида раствор.

Растворяют 0,75 г меди(II) хлорида и 1,5 г аммония хлорида в небольшом количестве воды. К раствору прибавляют 1,5 мл 25 % концентрированного раствора аммиака и доводят объём раствора водой до 25,0 мл.

Меди эдетата раствор.

К 2 мл 2 % раствора меди(II) ацетата прибавляют 2 мл 0,1 М раствора натрия эдетата и доводят объём раствора водой до 50,0 мл.

Медно-тартратный реактив.

Раствор I. 34,6 г меди(II) сульфата растворяют в воде и доводят объём раствора тем же растворителем до 500,0 мл.

Раствор II. 173 г калия-натрия тартрата и 50 г натрия гидроксида растворяют в 400 мл воды. Нагревают до кипения, охлаждают, доводят объём полученного раствора водой, свободной от углерода диоксида, до 500,0 мл.

Непосредственно перед использованием смешивают равный объёмы растворов I и II.

5 мл реактива разводят 5 мл воды и нагревают до кипения. Раствор должен оставаться прозрачным и не выделять даже следов осадка.

Медно-цитратный раствор.

25 г меди(II) сульфата, 50 г лимонной кислоты и 144 г натрия карбоната безводного растворяют в воде и доводят объём раствора тем же растворителем до 1000,0 мл.

Медь. [7440-50-8]. Cu. (А.м. 63,55). Медь.

Фольга очищенная, стружка, проволока или металлический порошок электролитической чистоты.

Мезитилоксид. [141-79-7]. $C_6H_{10}O$. (М.м. 98,14). 4-Метилпент-3-ен-2-он.

Бесцветная маслянистая жидкость.

Растворим в 30 частях воды, смешивается с большинством органических растворителей.

d_{20}^{20}. Около 0,858.

Температура кипения. От 129 до 130 °С.

Меламин. [108-78-1]. $C_3H_6N_6$. (М.м. 126,14). 1,3,5-Триазин-2,4,6-триамин.

Аморфный порошок белого цвета.

Очень мало растворим в воде и спирте 96 %.

Ментилацетат. [2623-23-6]. $C_{12}H_{22}O_2$. (М.м. 198,30).

[(1*R*,2*S*,5*R*)-5-Метил-2-(пропан-2-ил)циклогексил]ацетат.

Бесцветная жидкость.

Мало растворим в воде, смешивается со спиртом 96 % и эфиром.

d_{20}^{20}. Около 0,92.

n_D^{20}. Около 1,447.

Температура кипения. Около 225 °С.

Хроматографическая чистота ментилацетата, используемого в газовой хроматографии, должна быть не менее 98,0 %.

Ментол рацемический. [89-78-1].$C_{10}H_{20}O$. (М.м. 156,27).

rac-(1*R*,2*S*,5*R*)-5-Метил-2-(пропан-2-ил)циклогексанол.

Бесцветные кристаллы или белый кристаллический порошок или плавящаяся масса с сильным запахом мяты перечной.

Очень легко растворим в спирте 96 %, эфире, уксусной кислоте, легко растворим в жидком парафине и жирных маслах, очень мало растворим в воде.

Ментон. [14073-97-3]. $C_{10}H_{18}O$. (М.м. 154,25).

(2*S*,5*R*)-5-Метил-2-(пропан-2-ил)циклогексанон.

Содержит различные количества изоментона.

Бесцветная жидкость.

Очень мало растворим в воде, очень легко растворим в спирте 96 % и эфире.

d_{20}^{20}. Около 0,897.

n_D^{20}. Около 1,450.

Хроматографическая чистота ментона, используемого в газовой хроматографии, должна быть не менее 90,0 %.

Ментофуран. [17957-94-7]. $C_{10}H_{14}O$. (М.м. 150,22).

(6*R*)-3,6-Диметил-4,5,6,7-тетрагидробензофуран.

Жидкость слегка синеватого цвета.

Очень мало растворим в воде, растворим в спирте 96 %.

d_{15}^{20}. Около 0,965.

n_D^{20}. Около 1,480.

$[\alpha]_D^{20}$. Около + 93°.

Температура кипения. Около 196 °С.

Хроматографическая чистота ментофурана, используемого в газовой хроматографии, должна быть не менее 97,0 %.

2-Меркаптоэтанол. [60-24-2]. C_2H_6OS. (М.м. 78,13). 2-Сульфанилэтан-1-ол.

Жидкость. Смешивается с водой.

d_{20}^{20}. Около 1,116.

Температура кипения. Около 157 °С.

Метакриловая кислота. [79-41-4]. $C_4H_6O_2$. (М.м. 86,09).

2-Метилпроп-2-еновая кислота.

Бесцветная жидкость.

Растворима в воде, смешивается с этанолом и эфиром.

n_D^{20}. Около 1,431.

Температура кипения. Около 160 °С.

Температура плавления. Около 16 °С.

Метаниловый желтый. [587-98-4]. $C_{18}H_{14}N_3NaO_3S$. (М.м. 375,38).

3-{[4-(Фениламино)фенил]диазенил}бензолсульфонат натрия.

Порошок коричневато-желтого цвета.

Растворим в воде и спирте 96 %, очень мало растворим в эфире.

Метанилового желтого раствор 0,1 %. Раствор 1 г/л в метаноле.

Испытание на чувствительность. К 50 мл уксусной кислоты безводной прибавляют 0,1 мл раствора метанилового желтого; появляется розовато-красное окрашивание, которое должно перейти в фиолетовое при прибавлении 0,05 мл 0,1 М раствора хлорной кислоты.

Переход окраски от красной до оранжево-желтой в интервале pH 1,2 – 2,3.

Метанол. [67-56-1]. CH_4O. (М.м. 32,04). Метанол.

Прозрачная, бесцветная, воспламеняющаяся жидкость.

Смешивается с водой и спиртом 96 %.

d_{20}^{20}. От 0,791 до 0,793.

Температура кипения. От 64 до 65 °С.

Спирт метиловый абсолютированный.

Содержание метанола не менее 99,8 %.

Метанол особой чистоты.

Должен выдерживать требования для метанола и следующее дополнительное испытание.

Минимальное пропускание. 20 % при длине волны 210 нм; 50 % при длине волны 220 нм; 75 % при длине волны 230 нм; 95 % при длине волны 250 нм; 98 % при длине волны 260 нм и более.

Определение проводят, используя в качестве раствора сравнения воду.

Метанол для жидкостной хроматографии.

Метанол, используемый в жидкостной хроматографии, должен выдерживать следующие дополнительные испытания.

Содержит не менее 99,8 % CH_4O.

Оптическая плотность. Не более 0,17. Измеряют при длине волны 225 нм, используя в качестве раствора сравнения воду.

Метанол подкисленный.

1,0 мл хлористоводородной кислоты 25 % доводят метанолом до 100,0 мл.

Метанол безводный. [67-56-1]. Метанол абсолютированный. Спирт метиловый абсолютированный.

Содержание метанола не менее 99,8 %.

1000 мл метанола обрабатывают 5 г магния. Если необходимо, инициируют реакцию, прибавляя 0,1 мл 5,4 % раствора ртути(II) хлорида. После прекращения выделения газа жидкость перегоняют, отгон собирают в сухую емкость и защищают от влаги.

Вода. Не более 0,3 г/л.

Метанол, свободный от альдегидов.

25 г йода растворяют в 1 л метанола, полученный раствор прибавляют при постоянном перемешивании к 400 мл 1 М раствора натрия гидроксида, затем прибавляют 150 мл воды и выдерживают в течение 16 ч. Фильтруют и кипятят с обратным холодильником до исчезновения запаха йодоформа. Раствор подвергают фракционной перегонке.

Содержит не более 0,001 % альдегидов и кетонов.

Метанол, очищенный от карбонилсодержащих примесей.

1 л метилового спирта нагревают в течение 3 ч с 10 г 2,4-динитрофенилгидразина и 2 мл хлористоводородной кислоты концентрированной с обратным холодильником при температуре 100 °С. Затем метиловый спирт 2 раза перегоняют, собирая фракции, кипящие при температуре 64,5 °С.

25 мл спирта помещают в колбу вместимостью 300 мл, прибавляют 75 мл раствора 2,4-динитрофенилгидразина, нагревают при температуре 100 °С с обратным холодильником в течение 24 ч, спирт отгоняют, доводят 2 % раствором серной кислоты до 200,0 мл и выдерживают в течение 24 ч. Не должны образовываться кристаллы (альдегиды).

Метанол 90 %. Смешивают 90 мл метанола и 10 мл воды.

Метанол 50 %. Смешивают равные объёмы метанола и воды.

Метансульфоновая кислота. [75-75-2]. CH_4O_3S. (М.м. 96,11).

Метансульфоновая кислота.

Прозрачная, бесцветная жидкость, затвердевающая при температуре около 20 °С. Смешивается с водой, мало растворима в толуоле, практически нерастворима в гексане.

d_{20}^{20}. Около 1,48.

n_D^{20}. Около 1,430.

Метафосфорная кислота. [37267-86-0]. $(HPO_3)_n$. Метафосфорная кислота.

Стекловидные комочки или палочки, содержащие определенное количество натрия метафосфата. Гигроскопична.

Очень легко растворима в воде, растворима в спирте 96 %.

Хранят в воздухонепроницаемой упаковке.

Метил-4-аминобензоат. [619-45-4]. $C_8H_9NO_2$. (М.м. 151,16).

Метил(4-аминобензоат).

Температура плавления. От 110 до 113 °С.

4-Метиламинофенола сульфат. См. **Метол**.

Метилантранилат. [134-20-3]. $C_8H_9NO_2$. (М.м. 151,16).

Метил(2-аминобензоат).

Бесцветные кристаллы или жидкость от бесцветного до желтоватого цвета. Растворим в воде, легко растворим в спирте 96 % и эфире.

Температура плавления. От 24 до 25 °С.

Температура кипения. 256 °С.

Хроматографическая чистота метилантранилата, используемого в газовой хроматографии, должна быть не менее 95,0 %.

Метиларахидат. [1120-28-1]. $C_{21}H_{42}O_2$. (М.м. 326,56).

Метилэйкозаноат.

Содержит не менее 98,0 % $C_{21}H_{42}O_2$. Определение проводят методом газовой хроматографии.

Кристаллическая масса от белого до желтого цвета.

Растворим в спирте 96 % и петролейном эфире.

Температура плавления. Около 46 °С.

Метилацетат. [79-20-9]. $C_3H_6O_2$. (М.м. 74,08). Метилацетат.

Прозрачная, бесцветная жидкость.

Растворим в воде, смешивается со спиртом 96 % и эфиром.

d_{20}^{20}. Около 0,933.

n_D^{20}. Около 1,361.

Температура кипения. От 56 до 58 °С.

Метилбегенат. [929-77-1]. $C_{23}H_{46}O_2$. (М.м. 354,61). Метилдокозаноат.

Кристаллы или кристаллический порошок.

Практически нерастворим в воде, растворим в этаноле и эфире.

Температура плавления. От 54 до 55 °С.

(*R*)-(+)-α-Метилбензилизоцианат. [33375-06-3]. C_9H_9NO. (М.м. 147,17).

[(1*R*)-1-Изоцианатоэтил]бензол.

Содержит не менее 99,0 % C_9H_9NO.

Энантиомерная чистота не менее 99 %.

Бесцветная жидкость.

d_{20}^{20}. Около 1,045.

n_D^{20}. Около 1,514.

Температура кипения. От 55 до 56 °C при 2,5 мм.рт.ст.

Хранить при температуре от 2 до 8 °C.

(*S*)-(–)-α-Метилбензилизоцианат. [14649-03-7]. C_9H_9NO. (М.м. 147,17).

[(1*S*)-1-Изоцианатоэтил]бензол.

Содержит не менее 99,0 % C_9H_9NO.

Энантиомерная чистота не менее 99 %.

Бесцветная жидкость.

d_{20}^{20}. Около 1,045.

n_D^{20}. Около 1,514.

Температура кипения. От 55 до 56 °C при 2,5 мм.рт.ст.

Хранить при температуре от 2 до 8 °C.

Метилбензоат. [93-58-3]. $C_8H_8O_2$. (М.м. 136,15).

Метилбензоат.

Бесцветная жидкость.

d_4^{20}.1,088

Температура кипения. Около 200 °C.

Метилбензолсульфонат. [80-18-2]. $C_7H_8O_3S$. (М.м. 172,20).

Метилбензолсульфонат.

Прозрачная бесцветная жидкость.

Температура кипения. Около 148 °C.

Метилбензотиазолонгидразона гидрохлорид. [38894-11-0].

$C_8H_9N_3S \cdot HCl \cdot H_2O$. (М.м. 233,72).

2-Гидразинилиден-3-метил-2,3-дигидро-1,3-бензотиазола гидрохлорид, моногидрат.

Кристаллический порошок почти белого или желтоватого цвета.

Растворим в воде, умеренно растворим в спирте 96 %.

Температура плавления. Около 270 °C.

2-Метилбутан. [78-78-4]. C_5H_{12}. (М.м. 72,15). 2-Метилбутан.

Содержит не менее 99,5 % C_5H_{12}.

Бесцветная, легко воспламеняющаяся жидкость.

Практически нерастворим в воде, смешивается с этанолом и эфиром.

d_{20}^{20}. Около 0,621.

n_D^{20}. Около 1,354.

Температура кипения. Около 29 °С.

Вода. Не более 0,02 %.

Остаток после выпаривания. Не более 0,0003 %.

Минимальное пропускание. 50 % при длине волны 210 нм; 85 % при длине волны 220 нм; 98 % при длине волны 240 нм и более.

Определение проводят, используя в качестве раствора сравнения воду.

2-Метилбут-2-ен. [513-35-9]. C_5H_{10}. (М.м. 70,13). 2-Метилбут-2-ен.

Очень легко воспламеняющаяся жидкость.

Практически нерастворим в воде, смешивается со спиртом 96 % и эфиром.

Температура кипения. От 37,5 до 38,5 °С.

Метилдеканоат. [110-42-9]. $C_{11}H_{22}O_2$. (М.м. 186,29). Метилдеканоат.

Содержит не менее 99,0 % $C_{11}H_{22}O_2$.

Прозрачная, бесцветная или желтого цвета жидкость.

Растворим в петролейном эфире, практически нерастворим в воде, легко растворим в этаноле и эфире.

d_{20}^{20}. От 0,871 до 0,876.

n_D^{20}. От 1,425 до 1,426.

Метилдокозаноат. См. **Метилбегенат**.

3-*О*-Метилдопамина гидрохлорид. [1477-68-5]. $C_9H_{13}NO_2 \cdot HCl$. (М.м. 203,67). 4-(2-Аминоэтил)-2-метоксифенола гидрохлорид.

Температура плавления. От 213 до 215 °С.

4-*О*-Метилдопамина гидрохлорид. [645-33-0]. $C_9H_{13}NO_2 \cdot HCl$. (М.м. 203,67).

5-(2-Аминоэтил)-2-метоксифенола гидрохлорид.

Температура плавления. От 207 до 208 °С.

Метиленбисакриламид. [110-26-9]. $C_7H_{10}N_2O_2$. (М.м. 154,17).

N,*N*′-Метиленбис(проп-2-енамид).

Очень мелкий порошок белого или почти белого цвета.

Мало растворим в воде, растворим в спирте 96 %.

Температура плавления. 300 °С с разложением.

Метиленовый синий. [7220-79-3]. $C_{16}H_{18}ClN_3S \cdot 3H_2O$. (М.м. 373,90). 3,7-Бис(диметиламино)-5λ^4-фенотиазин-5-ий хлорид, тригидрат.

Кристаллический порошок темно-зеленого или бронзового цвета.

Легко растворим в воде, растворим в спирте 96 %.

Метиленового синего раствор. 0,15 % раствор.

0,15 г метиленового синего растворяют в воде и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл.

Метиленового синего спиртовой раствор. 0,1 % раствор в спирте 96 %.

Метиленхлорид. [75-09-2]. CH_2Cl_2. (М.м. 84,93). Дихлорметан.

Бесцветная жидкость.

Умеренно растворим в воде, смешивается со спиртом 96 % и эфиром.

Температура кипения. От 39 до 42 °С.

Метиленхлорид, используемый в флуориметрии, должен выдерживать следующее дополнительное испытание.

Флуоресценция. При облучении светом с длиной волны 365 нм поглощение, измеренное при длине волны 460 нм в кювете с толщиной слоя 1 см, не должно быть интенсивнее флуоресценции раствора, содержащего 0,002 ppm хинина в 0,5 М растворе серной кислоты, измеренного в тех же условиях.

Метиленхлорид подкисленный.

К 100 мл метиленхлорида прибавляют 10 мл кислоты хлористоводородной концентрированной, встряхивают. После разделения слоев используют нижний слой.

Метилизобутилкетон. [108-10-1]. $C_6H_{12}O$. (М.м. 100,16).

4-Метилпентан-2-он.

Прозрачная, бесцветная жидкость.

Мало растворим в воде, смешивается с большинством органических растворителей.

d_{20}^{20}. Около 0,80.

Температура кипения. Около 115 °С.

Температурные пределы перегонки. Перегоняют 100 мл. Интервал температуры перегонки не должен превышать 4,0 °С; должно перегоняться от 1 до 95 мл.

Остаток после выпаривания. Не более 0,01 %. Выпаривают при температуре 100 °С, остаток сушат при температуре от 100 до 105 °С.

Метилизобутилкетон очищенный.

50 мл свежеперегнанного метилизобутилкетона встряхивают с 0,5 мл хлористоводородной кислоты 25 % в течение 1 мин. После разделения слоев нижний слой отбрасывают.

Готовят непосредственно перед использованием.

Метилкаприлат. [111-11-5]. $C_9H_{18}O_2$. (М.м. 158,24). Метилоктаноат.

Бесцветная или желтоватая жидкость.

Практически нерастворим в воде; легко растворим в этаноле и эфире.

d_{20}^{20}. Около 0,876.

n_D^{20}. Около 1,417.

Температура кипения. От 193 до 194 °С.

Метилкапринат. См. **Метилдеканоат**.

Метилкапроат. [106-70-7]. $C_7H_{14}O_2$. (М.м. 130,18). Метилгексаноат.

Бесцветная или желтоватая жидкость.

Практически нерастворим в воде, легко растворим в этаноле и эфире.

d_{20}^{20}.Около 0,885.

n_D^{20}. Около 1,405.

Температура кипения. От 150 до 151 °С.

Метиллаурат. [111-82-0]. $C_{13}H_{26}O_2$. (М.м. 214,34). Метилдодеканоат.

Содержит не менее 98,0 % $C_{13}H_{26}O_2$. Определение проводят методом газовой хроматографии.

Бесцветная или желтого цвета жидкость.

Растворим в спирте 96 % и петролейном эфире.

d_{20}^{20}. Около 0,87.

n_D^{20}. Около 1,431.

Температура плавления. Около 5 °С.

Метиллигноцерат. [2442-49-1]. $C_{25}H_{50}O_2$. (М.м. 382,66).

Метилтетракозаноат.

Желтоватые хлопья.

Практически нерастворим в воде, растворим в этаноле и эфире.

Температура плавления. Около 58 °С.

Метиллинолеат. [112-63-0]. $C_{19}H_{34}O_2$. (М.м. 294,47). Метил[(9*Z*,12*Z*)-октадека-9,12-диеноат].

Желтоватая маслянистая жидкость.

Практически нерастворим в воде, растворим в этаноле, легко растворим в эфире.

d_{20}^{20}. Около 0,888.

n_D^{20}. Около 1,466.

Температура кипения. От 207 до 208 °С.

Метиллиноленат. [301-00-8]. $C_{19}H_{32}O_2$. (М.м. 292,46). Метил[(9*Z*,12*Z*,15*Z*)-октадека-9,12,15-триеноат].

Желтоватая маслянистая жидкость.

Практически нерастворим в воде, растворим в этаноле и эфире.

d_{20}^{20}. Около 0,901.

n_D^{20}. Около 1,471.

Температура кипения. Около 207 °С.

Метилмаргарат. [1731-92-6]. $C_{18}H_{36}O_2$. (М.м. 284,48).

Метилгептадеканоат.

Бесцветные или почти бесцветные пластинки.

Практически нерастворим в воде, растворим в этаноле и эфире.

Температура плавления. От 32 до 34 °С.

Метилметакрилат. [80-62-6]. $C_5H_8O_2$. (М.м. 100,12).

Метил(2-метилпроп-2-еноат).

Бесцветная жидкость.

Очень мало растворим в воде, смешивается с этанолом и эфиром.

d_{20}^{20}. Около 1,414.

Температура кипения. Около 100 °С.

Температура плавления. Около – 48 °С.

Содержит подходящий стабилизирующий реагент.

Метилмиристат. [124-10-7]. $C_{15}H_{30}O_2$. (М.м. 242,40).

Метилтетрадеканоат.

Содержит не менее 98,0 % $C_{15}H_{30}O_2$. Определение проводят методом газовой хроматографии.

Бесцветная или слабо-желтого цвета жидкость.

Растворим в спирте 96 % и петролейном эфире, практически нерастворим в воде.

d_{20}^{20}. Около 0,87.

n_D^{20}. Около 1,437.

Температура плавления. Около 20 °С.

Температура кипения. Около 156 °С.

2-Метил-5-нитроимидазол. [88054-22-2]. $C_4H_5N_3O_2$. (М.м. 127,10).

2-Метил-5-нитроимидазол.

Порошок от белого до светло-желтого цвета.

Температура плавления. От 252 до 254 °С.

Метиловый желтый. См. **Диметиловый желтый**.

Метиловый зеленый. [82-94-0]. $C_{26}H_{33}Cl_2N_3$. (М.м. 458,5).

4-{[4-(Диметиламино)фенил][4-(диметилиминиумил)циклогекса-2,5-диен-1-илиден]метил}-*N*,*N*,*N*-триметиланилиния дихлорид.

Порошок зеленого цвета.

Растворим в воде, растворим в серной кислоте концентрированной с образованием желтого окрашивания, переходящего в зеленое при разведении водой.

Метилового зеленого-йодомеркуратная бумага.

Тонкие полоски подходящей фильтровальной бумаги погружают в 4 % раствор метилового зеленого, сушат на воздухе, затем погружают их в течение 1 ч в раствор, содержащий 140 г/л калия йодида и 200 г/л ртути(II) йодида. Полоски промывают водой дистиллированной до тех пор, пока промывные воды не станут практически бесцветными, и сушат на воздухе.

Хранят в защищенном от света месте.

Срок годности 2 сут.

Метиловый красный. [493-52-7]. $C_{15}H_{15}N_3O_2$. (М.м. 269,30).

2-{[4-(Диметиламино)фенил]диазенил}бензойная кислота.

Порошок темно-красного цвета или кристаллы фиолетового цвета.

Практически нерастворим в воде, растворим в спирте 96 % при нагревании, растворим в разведённых растворах гидроксидов и углекислых солей щелочных металлов.

Метилового красного раствор 0,05 %.

50 мг растворяют в смеси 1,86 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида и 50 мл спирта 96 %, доводят объём раствора водой до 100,0 мл.

Испытание на чувствительность. К 100 мл воды, свободной от углерода диоксида, прибавляют 0,1 мл раствора метилового красного и 0,05 мл 0,02 М раствора хлористоводородной кислоты; появляется красное окрашивание, которое должно перейти в желтое при прибавлении не более 0,1 мл 0,02 М раствора натрия гидроксида.

Переход окраски от красной до желтой в интервале pH 4,4 – 6,0.

Метилового красного раствор 0,04 %.

0,1 г метилового красного растворяют в 18,6 мл 0,02 М раствора натрия гидроксида и доводят объём раствора водой, свободной от углерода диоксида, до 250,0 мл. Переход окраски от красной к желтой в интервале pH 4,2 – 6,2.

Метилового красного спиртовой раствор 0,2 %.

0,2 г метилового красного растворяют в 100 мл 60 % спирта. Срок годности раствора – 6 месяцев.

Метилового красного спиртовой раствор 0,1 %. 0,1 % раствор в спирте 96 %.

Переход окраски от красной к желтой в интервале pH 4,2 – 6,2.

Метилового красного смешанный раствор.

0,1 г метилового красного и 50 мг метиленового синего растворяют в 100,0 мл спирта 96 %.

Переход окраски от красно-фиолетовой до зеленой в интервале pH 5,2 – 5,6.

Метиловый оранжевый. [547-58-0]. $C_{14}H_{14}N_3NaO_3S$. (М.м. 327,33).

4-{[4-(Диметиламино)фенил]диазенил}бензолсульфонат натрия.

Кристаллический порошок оранжево-желтого цвета.

Мало растворим в воде, легко растворим в горячей воде, практически нерастворим в спирте 96 %, других органических растворителях.

Метилового оранжевого смешанный раствор.

20 мг метилового оранжевого и 0,1 г бромкрезолового зеленого растворяют в 1 мл 0,2 М раствора натрия гидроксида и доводят объём раствора водой до 100,0 мл.

Переход окраски от оранжевой до желтовато-зеленой в интервале pH 3,0 – 4,4.

Метилового оранжевого спиртовой раствор 0,1 %.

0,1 г метилового оранжевого растворяют в 80 мл воды и доводят объём раствора спиртом 96 % до 100,0 мл.

Испытание на чувствительность. К 100 мл воды, свободной от углерода диоксида, прибавляют 0,1 мл раствора метилового оранжевого; появляется

желтое окрашивание, которое должно перейти в красное при прибавлении не более 0,1 мл 0,1 М раствора хлористоводородной кислоты.

Переход окраски от красной до желтой в интервале pH 3,0 – 4,4.

Метилового оранжевого раствор в ацетоне.

0,025 г метилового оранжевого растворяют в 100 мл ацетона. Раствор встряхивают периодически в течение 1 ч, затем фильтруют.

Переход окраски от красной до желтой в интервале pH 3,0 – 4,4.

Метиловый фиолетовый. [8004-87-3]. $C_{24}H_{28}ClN_3$. (М.м. 393,95).

4-{[4-(Диметиламино)фенил][4-(метилимино)циклогекса-2,5-диен-1-илиден]метил}-*N*,*N*-диметиланилина гидрохлорид.

Кристаллический порошок с неоднородной (по размеру) формой частиц зеленого цвета с металлическим блеском.

Растворим в воде, растворах неорганических кислот и разведённых растворах гидроксидов щелочных металлов.

Переход окраски раствора от желтой к зеленой в интервале pH 0,1 – 1,5 и от зеленой к фиолетовой в интервале pH 1,5 – 3,2.

Метилового фиолетового раствор 0,1 %.

0,1 г индикатора растворяют в 100,0 мл воды.

Метилового фиолетового уксуснокислый раствор.

0,1 % раствор в уксусной кислоте ледяной.

Используют свежеприготовленным.

Метилолеат. [112-62-9]. $C_{19}H_{36}O_2$. (М.м. 296,49). Метил[(9*Z*)-октадец-9-еноат].

Содержит не менее 98,0 % $C_{19}H_{36}O_2$. Определение проводят методом газовой хроматографии.

Бесцветная или слабо-желтого цвета маслянистая жидкость.

Практически нерастворим в воде, смешивается с этанолом и эфиром.

d_{20}^{20}. Около 0,88.

n_D^{20}. Около 1,452.

Температура кипения. Около 216 °С.

Метилпальмитат. [112-39-0]. $C_{17}H_{34}O_2$. (М.м. 270,45). Метилгексадеканоат.

Содержит не менее 98,0 % $C_{17}H_{34}O_2$. Определение проводят методом газовой хроматографии.

Кристаллическая масса белого или желтого цвета.

Растворим в спирте 96 % и петролейном эфире, практически нерастворим в воде.

Температура плавления. Около 30 °С.

Метилпальмитолеат. [1120-25-8]. $C_{17}H_{32}O_2$. (М.м. 268,43).

Метил[(9*Z*)-9-гексадеценоат].

Желтоватая жидкость.

Практически нерастворим в воде, смешивается с этанолом и эфиром.

d_{20}^{20}. Около 0,876.

n_D^{20}. Около 1,451.

Метилпарагидроксибензоат. [99-76-3]. $C_8H_8O_3$. (М.м. 152,15).

Метил[4-гидроксибензоат].

Белый кристаллический порошок или бесцветные кристаллы.

Очень мало растворим в воде, легко растворим в спирте 96 % и метаноле.

Температура плавления. От 125 до 128 °С.

4-Метилпентан-2-ол. [108-11-2]. $C_6H_{14}O$. (М.м. 102,17).

4-Метилпентан-2-ол.

Прозрачная, бесцветная, летучая жидкость.

Растворим в воде, смешивается с этанолом и эфиром.

d_{20}^{20}. Около 0,802.

n_D^{20}. Около 1,411.

Температура кипения. Около 132 °С.

Метилпиперазин. [109-01-3]. $C_5H_{12}N_2$. (М.м. 100,16).

1-Метилпиперазин.

Бесцветная жидкость.

Смешивается с водой и спиртом 96 %.

d_{20}^{20}. Около 0,90.

n_D^{20}. Около 1,466.

Температура кипения. Около 138 °С.

4-(4-Метилпиперидино)пиридин. [80965-30-6]. $C_{11}H_{16}N_2$. (М.м. 176,26). 4-(4-Метилпиперидин-1-ил)пиридин.

Прозрачная жидкость.

n_D^{20}. Около 1,565.

***N*-Метилпирролидин**. [120-94-5]. $C_5H_{11}N$. (М.м. 85,15). 1-Метилпирролидин.

Температура кипения. Около 80 °С.

***N*-Метилпирролидон**. [872-50-4]. C_5H_9NO. (М.м. 99,13).

1-Метилпирролидин-2-он.

d_{20}^{20}. Около 1,028.

Температура кипения. Около 202 °С.

Температура плавления. Около – 24 °С.

2-Метилпропанол. [78-83-1]. $C_4H_{10}O$. (М.м. 74,12). 2-Метилпропан-1-ол.

Прозрачная, бесцветная жидкость.

Растворим в воде, смешивается со спиртом 96 % и эфиром.

d_{20}^{20}. Около 0,80.

n_D^{15}. От 1,397 до 1,399.

Температура кипения. Около 107 °С.

Температурные пределы перегонки. От 107 до 109 °С; должно перегоняться не менее 96 %.

2-Метил-2-пропанол. [75-65-0]. $C_4H_{10}O$. (М.м. 74,12). 2-Метилпропан-2-ол.

Прозрачная, бесцветная жидкость или кристаллическая масса.

Растворим в воде, смешивается со спиртом 96 % и эфиром.

Температура затвердевания. Около 25 °С.

Температурные пределы перегонки. От 81 до 83 °С; должно перегоняться не менее 95 %.

Метилсалицилат. [119-36-8]. $C_8H_8O_3$. (М.м. 152,15).

Метил[2-гидроксибензоат].

Бесцветная или слегка желтоватая жидкость.

Очень слабо растворим в воде, смешивается с этанолом 96 %, с жирными и эфирными маслами.

d_4^{20}. Около 1,18.

Температура кипения. Около 223 °С.

Температура плавления. Около -8 °С.

Метилстеарат. [112-61-8]. $C_{19}H_{38}O_2$. (М.м. 298,50).

Метилоктадеканоат.

Содержит не менее 98,0 % $C_{19}H_{38}O_2$. Определение проводят методом газовой хроматографии.

Кристаллическая масса белого или желтого цвета.

Растворим в спирте 96 % и петролейном эфире.

Температура плавления. Около 38 °С.

Метилтридеканоат. [1731-88-0]. $C_{14}H_{28}O_2$. (М.м. 228,37).

Метилтридеканоат.

Бесцветная или слабо-желтого цвета жидкость.

Растворим в спирте 96 % и петролейном эфире.

d_{20}^{20}. Около 0,86.

n_D^{20}. Около 1,441.

Температура плавления. Около 6 °С.

Метилтрикозаноат. [2433-97-8]. $C_{24}H_{48}O_2$. (М.м. 368,64).

Метилтрикозаноат.

Содержит не менее 99,0 % $C_{24}H_{48}O_2$.

Кристаллы белого цвета.

Практически нерастворим в воде, растворим в гексане.

Температура плавления. От 55 до 56 °С.

Метилфенилоксазолилбензол. [3073-87-8]. $C_{26}H_{20}N_2O_2$. (М.м. 392,45).

2,2'-(1,4-Фенилен)бис(4-метил-5-фенил-1,3-оксазол).

Мелкий порошок зеленовато-желтого цвета с синей флуоресценцией или мелкие кристаллы.

Растворим в спирте 96 %, умеренно растворим в ксилоле.

Температура плавления. Около 233 °С.

Метилфенилоксазолилбензол, используемый для жидкостной сцинтилляции, должен быть соответствующей степени чистоты.

Метилфталеин. См. **Фталеиновый пурпуровый**.

Метилцеллозольв. См. **Этиленгликоля монометиловый эфир.**

Метилцеллюлоза 450. [9004-67-5].

Представляет собой частично *О*-метилированную целлюлозу.

Белый или желтовато-белый или серовато-желтый порошок или гранулы. Гигроскопична после высушивания.

Практически нерастворима в горячей воде, ацетоне, этаноле, эфире и толуоле, растворима в холодной воде, образуя коллоидные растворы.

Номинальная вязкость. 450 мПа·с.

Метилциннамат. [103-26-4]. $C_{10}H_{10}O_2$. (М.м. 162,19).

Метил(3-фенилпроп-2-еноат).

Бесцветные кристаллы.

Практически нерастворим в воде, легко растворим в спирте 96 % и растворим в эфире.

n_D^{20}. Около 1,56.

Температура кипения. Около 260 °С.

Температура плавления. От 34 до 36 °С.

***N*-Метилцитизин**. [486-86-2]. $C_{12}H_{16}N_2O$. (М.м. 204,27).

(1*R*,5*S*)-3-Метил-1,5-метано-1,2,3,4,5,6-гексагидро-8*H*-пиридо[1,2-*a*][1,5]диазоцин-8-он.

Содержит не менее 98 % $C_{12}H_{16}N_2O$.

Вещество белого или почти белого цвета.

Температура плавления: 135–137 °С.

Метилэтилкетон. [78-93-3]. C_4H_8O. (М.м. 72,11). Бутан-2-он.

Прозрачная, бесцветная, воспламеняющаяся жидкость.

Очень легко растворим в воде, смешивается со спиртом 96 % и эфиром.

d_{20}^{20}. Около 0,81.

Температура кипения. От 79 до 80 °С.

Метилэйкозаноат. См. **Метиларахидат**.

Метионин. [59-51-8]. $C_5H_{11}NO_2S$. (М.м. 149,21).

(2*RS*)-2-Амино-4-(метилсульфанил)бутановая кислота.

Белый или почти белый кристаллический порошок или бесцветные кристаллы.

Растворим в воде, очень мало растворим в спирте.

3-Метокси-L-тирозин. [200630-46-2]. $C_{10}H_{13}NO_4$. (М.м. 229,23).

(2*S*)-2-Амино-3-(4-гидрокси-3-метоксифенил)пропановая кислота, моногидрат.

Почти белый или жёлтый порошок.

Хранить при температуре 2–8°С.

Метоксифенилуксусная кислота. [7021-09-2]. $C_9H_{10}O_3$. (М.м. 166,17).

(2*RS*)-2-Метокси-2-фенилуксусная кислота.

Кристаллический порошок белого цвета или кристаллы белого или почти белого цвета.

Умеренно растворима в воде, легко растворима в спирте 96 % и эфире.

Температура плавления. Около 70 °С.

Хранят в прохладном месте.

Метоксифенилуксусной кислоты реактив.

2,7 г метоксифенилуксусной кислоты растворяют в 6 мл 10 % раствора тетраметиламмония гидроксида и прибавляют 20 мл этанола.

Хранят в полиэтиленовой упаковке.

Метоксихлор. [72-43-5]. $C_{16}H_{15}Cl_3O_2$. (М.м. 345,65).

1,1'-(2,2,2-Трихлорэтан-1,1-диил)бис(4-метоксибензол).

Практически нерастворим в воде. Легко растворим в большинстве органических растворителей.

Температура кипения. Около 346 °С.

Температура плавления. От 78 до 86 °С.

Метол. [55-55-0]. $C_{14}H_{18}N_2O_2 \cdot H_2SO_4$. (М.м. 344,38). 4-(Метиламино)фенола сульфат (2:1).

Бесцветные кристаллы или белый кристаллический порошок.

Растворим в воде, мало растворим в этаноле, практически нерастворим в эфире.

Температура плавления. От 250 до 260 °С с разложением.

Миозмин. [532-12-7]. $C_9H_{10}N_2$. (М.м. 146,19).

3-(3,4-Дигидро-2*H*-пиррол-5-ил)пиридин.

Бесцветные кристаллы.

Практически нерастворим в воде, растворим в этаноле и эфире.

Температура плавления. Около 45 °С.

Миристиловый спирт. [112-72-1]. $C_{14}H_{30}O$. (М.м. 214,39).

Тетрадекан-1-ол.

Листочки, кристаллизующиеся из этанола.

Очень мало растворим в этаноле, растворим в эфире.

d_{20}^{20}. Около 0,823.

Температура плавления. От 38 до 40 °С.

Миристицин. [607-91-0]. $C_{11}H_{12}O_3$. (М.м. 192,21).

4-Метокси-6-(проп-2-ен-1-ил)-2*H*-1,3-бензодиоксол.

Бесцветная или с желтоватым оттенком маслянистая жидкость.

Практически нерастворим в воде, мало растворим в этаноле, растворим в эфире, смешивается с толуолом и ксилолом.

d_{20}^{20}. Около 1,144.

n_D^{20}. Около 1,540.

Температура кипения. От 276 до 277 °С.

Температура плавления. Около 173 °С.

Хранят в прохладном, защищенном от света месте.

β-Мирцен. [123-35-3]. $C_{10}H_{16}$. (М.м. 136,23).

7-Метил-3-метиленокта-1,6-диен.

Маслянистая желтоватая жидкость с приятным запахом.

Практически нерастворим в воде, смешивается со спиртом 96 %, растворим в эфире и уксусной кислоте ледяной, растворах гидроксидов щелочных металлов.

d_{20}^{20}. Около 0,794.

n_D^{20}. Около 1,470.

Хроматографическая чистота β-мирцена, используемого в газовой хроматографии, должна быть не менее 90,0 %.

Молекулярное сито.

Молекулярное сито состоит из натрия алюмосиликата. Имеет вид шариков с размерами пор 0,4 нм и диаметром 2 мм.

Молибденованадиевый реактив.

В стакане вместимостью 150 мл смешивают растертые в порошок 4,0 г аммония молибдата и 0,1 г аммония ванадата, прибавляют 70 мл воды и перемешивают стеклянной палочкой до растворения. Через несколько минут должен получиться прозрачный раствор, к которому прибавляют 20 мл азотной кислоты концентрированной и доводят объём раствора водой до 100,0 мл.

Молибденовая кислота. [7782-91-4]. H_2MoO_4. (М.м. 161,95).

Молибденовая кислота.

Белый или белый с желтоватым оттенком порошок.

Мало растворима в воде, реагирует с разведёнными растворами гидроксидов щелочных металлов, растворима в горячей серной кислоте концентрированной.

Молочная кислота. [50-21-5]. $C_3H_6O_3$. (М.м. 90,08).

(2*RS*)-2-Гидроксипропановая кислота.

Бесцветная или слегка желтоватая, сиропообразная жидкость.

Смешивается с водой, спиртом 96 % и эфиром.

d_{20}^{20}. Около 1,205.

Молочной кислоты реактив.

Раствор I. К 60 мл молочной кислоты прибавляют 45 мл раствора молочной кислоты, насыщенного без нагревания суданом красным G и предварительно отфильтрованного. Молочная кислота насыщается медленно без нагревания, поэтому всегда необходим избыток красителя.

Раствор II. Готовят 10 мл насыщенного раствора анилина и фильтруют.

Раствор III. 75 мг калия йодида растворяют в воде и доводят тем же растворителем до 70 мл. К полученному раствору прибавляют 10 мл спирта 96 % и 0,1 г йода, встряхивают.

Смешивают растворы I и II, прибавляют раствор III.

Морфолин. [110-91-8]. C_4H_9NO. (М.м. 87,12). Морфолин.

Бесцветная, гигроскопичная, воспламеняющаяся жидкость.

Растворим в воде и спирте 96 %.

d_{20}^{20}. Около 1,01.

Температурные пределы перегонки. От 126 до 130 °С; должно перегоняться не менее 95 %.

Хранят в воздухонепроницаемой упаковке.

4-Морфолинпропансульфокислота. [1132-61-2]. $C_7H_{15}NO_4S$. (М.м. 209,26).

3-(Морфолин-4-ил)пропан-1-сульфоновая кислота.

Сордержит не менее 99,5 % $C_7H_{15}NO_4S$.

Хорошо растворима в воде.

Температура плавления. Около 280 °С.

4-Морфолинэтансульфокислота. [4432-31-9]. $C_6H_{13}NO_4S$. (М.м. 195,24).

2-(Морфолин-4-ил)этан-1-сульфоновая кислота.

Сордержит не менее 99 % $C_6H_{13}NO_4S$.

Хорошо растворима в воде.

Температура плавления. Более 300 °С.

4-Морфолинэтансульфокислота моногидрат. [145224-94-8].

$C_6H_{13}NO_4S \cdot H_2O$. (М.м. 213,25).

2-(Морфолин-4-ил)этансульфоновой кислоты моногидрат.

Содержит не менее 99 % $C_6H_{13}NO_4S \cdot H_2O$.

Легко растворим в воде.

Температура плавления. Более 300 °С.

Мочевина. [57-13-6]. CH_4N_2O. (М.м. 60,06). Карбонодиамид.

Белый кристаллический порошок или бесцветные кристаллы.

Очень легко растворима в воде, растворима в спирте 96 %, практически нерастворима в метиленхлориде.

Муравьиная кислота безводная. [64-18-6]. CH_2O_2. (М.м. 46,03).

Муравьиная кислота.

Содержит не менее 98,0 % (м/м) CH_2O_2.

Бесцветная прозрачная жидкость. Вызывает коррозию.

Смешивается с водой и спиртом 96 %.

d_{20}^{20}. Около 1,22.

Муравьиная кислота 85%.

Содержит не менее 85,0 % (м/м) CH_2O_2.

Бесцветная прозрачная жидкость с резким запахом.

Смешивается с водой и спиртом 96 %.

Мурексид. См. **Аммоний пурпурнокислый**.

Мышьяка(III) оксид. [1327-53-3]. As_2O_3. (М.м. 197,84). Оксид мышьяка(III).

Кристаллический порошок или белая масса.

Мало растворим в воде, растворим в кипящей воде. Реагирует с разведёнными растворами гидроксидов и карбонатов щелочных металлов.

Натр едкий. **Натрия гидроокись**. См. **Натрия гидроксид**.

Натрий. [7440-23-5]. Na. (А.м. 22,99). Натрий.

Металл, на свежем срезе имеет блестящую серебристо-серую поверхность. На воздухе быстро тускнеет и полностью окисляется до натрия оксида,

который превращается в натрия карбонат. Бурно реагирует с водой с образованием водорода и натрия гидроксида.

Растворим в безводном метаноле с образованием водорода и натрия метилата, практически нерастворим в эфире и петролейном эфире.

Хранят в петролейном эфире или жидком парафине (например, керосин).

Натрия азид. [26628-22-8]. NaN_3. (М.м. 65,01).

Азид натрия.

Кристаллический порошок или кристаллы белого цвета.

Легко растворим в воде, мало растворим в спирте 96 %, практически нерастворим в эфире.

Натрий азотнокислый. См. **Натрия нитрат**.

Натрий азотистокислый. См. **Натрия нитрит**.

Натрия арсенита раствор.

0,50 г мышьяка(III) оксида растворяют в 5 мл раствора натрия гидроксида разведённого 8,5 %, прибавляют 2,0 г натрия гидрокарбоната и доводят объём раствора водой до 100,0 мл.

Натрия аскорбата раствор.

3,5 г аскорбиновой кислоты растворяют в 20 мл 1 М раствора натрия гидроксида.

Готовят непосредственно перед использованием.

Натрия ацетат. [6131-90-4]. $C_2H_3NaO_2 \cdot 3H_2O$. (М.м. 136,08). Ацетат натрия, тригидрат.

Бесцветные прозрачные кристаллы, выветриваются в теплом воздухе.

Очень легко растворим в воде, растворим в спирте 96 %.

Натрия ацетата раствор 13,6 %.

13,6 г натрия ацетата растворяют в воде и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл.

Натрия ацетата раствор 10 %.

10 г натрия ацетата растворяют в воде и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл.

Натрия ацетата раствор 5 М.

680,4 г натрия ацетата растворяют в достаточном количестве воды и доводят объём раствора тем же растворителем до 1000,0 мл

Натрия ацетата раствор 2 М.

272,16 г натрия ацетата растворяют в достаточном количестве воды и доводят объём раствора тем же растворителем до 1000,0 мл.

Натрия ацетата раствор 0,1 М.

1,36 г натрия ацетата растворяют в воде и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл.

Раствор хранят при температуре 4 – 8 °С в течение 3 мес.

Натрия ацетата раствор 0,01 М.

0,680 г натрия ацетата тригидрата растворяют в воде и доводят объём раствора тем же растворителем до 500,0 мл.

Раствор хранят при температуре 4 – 8 °С в течение 1 мес.

Натрия ацетата раствор 0,001 М.

10,0 мл натрия ацетата раствора 0,01 М доводят водой до 100 мл.

Используют свежеприготовленным.

Натрия ацетат безводный. [127-09-3]. $C_2H_3NaO_2$. (М.м. 82,03). Ацетат натрия.

Бесцветные кристаллы или гранулы.

Очень легко растворим в воде, умеренно растворим в спирте 96 %.

Потеря в массе при высушивании. Не более 2,0 %. Определение проводят при температуре от 100 до 105 °С.

Натрия бензоат. [532-32-1]. $C_7H_5NaO_2$. (М.м. 144,10).

Бензоат натрия.

Белый кристаллический порошок.

Растворим в воде, растворим в спирте 96 % при нагревании.

Натрия бикарбонат. См. **Натрия гидрокарбонат**.

Натрия бисульфит. **Натрий сернистокислый**. См. **Натрия гидросульфит**.

Натрия бутансульфонат. [2386-54-1]. $C_4H_9NaO_3S$. (М.м. 160,17).

Бутан-1-сульфонат натрия.

Кристаллический порошок белого цвета.

Растворим в воде.

Температура плавления. Более 300 °С.

Натрия висмутат. [12232-99-4]. $NaBiO_3$. (М.м. 279,97).

Метависмутат(V) натрия.

Содержит не менее 85,0 % $NaBiO_3$.

Порошок желтого или желтовато-коричневого цвета. Медленно разлагается под действием влаги или высокой температуры.

Практически нерастворим в холодной воде.

Натрия вольфрамат. [10213-10-2]. $Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$. (М.м. 329,86).

Вольфрамат(VI) натрия, дигидрат.

Кристаллический порошок белого цвета или бесцветные кристаллы.

Легко растворим в воде с образованием прозрачного раствора, практически нерастворим в спирте 96 %.

Натрия гексансульфонат. [2832-45-3]. $C_6H_{13}NaO_3S$. (М.м. 188,22).

Гексан-1-сульфонат натрия.

Порошок белого или почти белого цвета.

Легко растворим в воде.

Натрия гептансульфонат. [22767-50-6]. $C_7H_{15}NaO_3S$. (М.м. 202,25).

Гептан-1-сульфонат натрия.

Кристаллическая масса белого или почти белого цвета.

Легко растворим в воде, растворим в метаноле.

Натрия гептансульфонат, моногидрат. [207300-90-1]. $C_7H_{15}NaO_3S \cdot H_2O$. (М.м. 220,26). Гептан-1-сульфонат натрия, моногидрат.

Содержит не менее 96 % $C_7H_{15}NaO_3S$ в пересчете на безводное вещество.

Кристаллический порошок белого цвета.

Растворим в воде, очень мало растворим в этаноле, практически нерастворим в эфире.

Вода. Не более 8 %. Определение проводят из 0,3 г.

Натрия гидрокарбонат. [144-55-8]. $NaHCO_3$. (М.м. 84,01). Гидрокарбонат натрия.

Белый кристаллический порошок.

Растворим в воде, практически нерастворим в спирте 96 %.

Натрия гидрокарбоната раствор 5 %.

5 г натрия гидрокарбоната растворяют в воде и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл.

Натрия гидрокарбоната раствор 5 % водно-спиртовой. 5,0 г натрия гидрокарбоната растворяют в смеси спирт 96 % – вода 30:70 и доводят объём раствора этой же смесью до 100,0 мл.

Срок годности раствора не более 30 сут при хранении в прохладном, защищённом от света месте.

Натрия гидрокарбоната раствор 4,2 %.

4,2 г натрия гидрокарбоната растворяют в воде и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл.

Натрия гидрокарбоната раствор 2 %.

2 г натрия гидрокарбоната растворяют в воде и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл.

Натрия гидрокарбоната раствор 0,6 %.

0,6 г натрия гидрокарбоната растворяют в воде и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл.

Натрия гидроксид. [1310-73-2]. NaOH. (М.м. 40,00). Гидроксид натрия.

Белые куски или цилиндрические палочки, имеющие на изломе кристаллическую структуру; гигроскопичен. Обращаться с осторожностью.

Очень легко растворим в воде; легко растворим в спирте 96 %, растворим в глицерине; очень мало растворим в ацетоне и эфире.

Натрия гидроксида раствор 40 %.

40,0 г натрия гидроксида растворяют в воде и после охлаждения доводят объём раствора водой до 100,0 мл. Раствору дают отстояться и прозрачную жидкость сливают с осадка.

Срок годности раствора 6 мес при хранении в стеклянном сосуде с резиновой пробкой.

Натрия гидроксида раствор 30 %.

30,0 г натрия гидроксида растворяют в воде и после охлаждения доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл. Раствору дают отстояться и прозрачную жидкость сливают с осадка.

Срок годности раствора 6 мес при хранении в стеклянном сосуде с резиновой пробкой.

Натрия гидроксида раствор 20 %.

20 г натрия гидроксида растворяют в воде и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл. Раствору дают отстояться и прозрачную жидкость сливают.

Хранят в стеклянных сосудах с резиновыми пробками.

Натрия гидроксида раствор 10 %.

10 г натрия гидроксида растворяют в воде и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл. Раствору дают отстояться и прозрачную жидкость сливают.

Хранят в стеклянных сосудах с резиновыми пробками.

Натрия гидроксида раствор 8,5 %.

8,5 г натрия гидроксида растворяют в воде и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл.

Натрия гидроксида раствор 5 %.

5 г натрия гидроксида растворяют в воде и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл.

Натрия гидроксида раствор 2 %.

2,0 г натрия гидроксида растворяют в воде и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл.

Натрия гидроксида раствор 1 %.

1,0 г натрия гидроксида растворяют в воде и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл.

Натрия гидроксида раствор 10 М.

400,0 г натрия гидроксида растворяют в достаточном количестве воды, свободной от углерода диоксида, и доводят объём раствора тем же растворителем до 1000,0 мл.

Натрия гидроксида раствор 5 М.

100,0 г натрия гидроксида растворяют в достаточном количестве воды, свободной от углерода диоксида, и доводят объем раствора тем же растворителем до 500,0 мл

Натрия гидроксида раствор 4 М.

80,0 г натрия гидроксида растворяют в достаточном количестве воды, свободной от углерода диоксида, и доводят объем раствора тем же растворителем до 500,0 мл.

Натрия гидроксида раствор 3,5 М.

70,0 г натрия гидроксида растворяют в воде и доводят объём раствора тем же растворителем до 500,0 мл.

Натрия гидроксида раствор 2 М.

80,0 г натрия гидроксида растворяют в воде, свободной от углерода диоксида, и доводят объём раствора тем же растворителем до 1000,0 мл.

Натрия гидроксида раствор 1 М.

40 г натрия гидроксида растворяют в воде, свободной от углерода диоксида, и доводят объём раствора тем же растворителем до 1000,0 мл.

Натрия гидроксида раствор 0,5 М.

20 г натрия гидроксида растворяют в воде, свободной от углерода диоксида, и доводят объём раствора тем же растворителем до 1000,0 мл.

Натрия гидроксида раствор 0,2 М.

8,0 г натрия гидроксида растворяют в воде, свободной от углерода диоксида, и доводят объём раствора тем же растворителем до 1000,0 мл.

Натрия гидроксида раствор 0,1 М.

4,0 г натрия гидроксида растворяют в воде, свободной от углерода диоксида, и доводят объём раствора тем же растворителем до 1000,0 мл.

Натрия гидроксида раствор 0,02 М.

2,0 мл натрия гидроксида раствора 1 М доводят водой до 100,0 мл.

Используют свежеприготовленным.

Натрия гидроксида метанольный раствор.

40 мг натрия гидроксида растворяют в 50 мл воды, полученный раствор охлаждают и прибавляют 50 мл метанола.

Используют свежеприготовленным.

Натрия гидроксида раствор концентрированный.

42 г натрия гидроксида растворяют в воде и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл.

Натрия гидроксида раствор 17 %.

85,0 г натрия гидроксида помещают в мерную колбу вместимостью 500 мл, растворяют в воде, охлаждают, доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

Натрия гидроксида спиртовой раствор 10 %.

Раствор 100 г/л в спирте 96 %.

Натрия гидросульфит. [7631-90-5]. $NaHSO_3$. (М.м. 104,06). Гидросульфит натрия.

Кристаллический порошок белого цвета. На воздухе частично теряет серы диоксид и постепенно окисляется до сульфата.

Легко растворим в воде, умеренно растворим в спирте 96 %.

Натрия гидрофосфат. См. **Динатрия гидрофосфат**.

Натрия гипобромита раствор.

20 мл раствора натрия гидроксида концентрированного и 500 мл воды смешивают на ледяной бане, прибавляют 5 мл раствора брома и осторожно перемешивают до растворения.

Готовят непосредственно перед использованием.

Натрия гипофосфит. [10039-56-2]. $NaH_2PO_2 \cdot H_2O$. (М.м. 105,99).

Фосфинат натрия, моногидрат.

Кристаллический порошок белого цвета или бесцветные кристаллы. Гигроскопичен.

Легко растворим в воде, растворим в спирте 96 %.

Хранят в воздухонепроницаемой упаковке.

Натрия гипофосфита раствор (реактив Тиле).

20 г натрия гипофосфита растворяют в 40 мл воды. Раствор вливают в 180 мл хлористоводородной кислоты концентрированной и выдерживают в течение 24 ч. По осаждении выделившихся кристаллов натрия хлорида жидкость сливают с осадка. Раствор должен быть бесцветным.

Хранят в стеклянном сосуде с притертой пробкой.

Натрия гипохлорита раствор концентрированный.

Содержит не менее 25 г/л и не более 30 г/л активного хлора.

Жидкость желтоватого цвета, имеет щелочную реакцию.

Хранят в защищенном от света месте.

Количественное определение. 10 мл раствора натрия гипохлорита концентрированного растворяют в воде и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл (раствор А). В колбу для титрования последовательно помещают 50 мл воды, 1,0 г калия йодида, 12,5 мл уксусной кислоты разведённой 12 %, 10 мл раствора А и титруют 0,1 М раствором натрия тиосульфата, используя в качестве индикатора 1 мл раствора крахмала.

1 мл 0,1 М раствора натрия тиосульфата соответствует 3,546 мг активного хлора.

Натрия глюкуронат. [207300-70-7]. $C_6H_9NaO_7 \cdot H_2O$. (М.м. 234,14).

D-глюкопирануронат натрия, моногидрат.

Умеренно растворим в воде, мало растворим в спирте 96 %.

$[\alpha]_D^{20}$. Около + 21,5° (2 % раствор).

Натрия дезоксихолат. [302-95-4]. $C_{24}H_{39}NaO_4$. (М.м. 414,6).

3α,12α-Дигидрокси-5β-холан-24-оат натрия.

Кристаллический порошок от белого до кремового цвета.

Легко растворим в воде.

$[\alpha]_D^{20}$. Около + 44° (2 % раствор).

Натрия декансульфонат. [13419-61-9]. $C_{10}H_{21}NaO_3S$. (М.м. 244,33).

Декан-1-сульфонат натрия.

Кристаллический порошок или хлопья белого или почти белого цвета.

Легко растворим в воде, растворим в метаноле.

Натрия дигидрофосфат безводный. [7558-80-7]. NaH_2PO_4. (М.м. 119,98).

Дигидрофосфат натрия.

Порошок белого цвета, гигроскопичен.

Хранят в воздухонепроницаемой упаковке.

Натрия дигидрофосфат моногидрат. [10049-21-5]. $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$.

(М.м. 137,99).

Дигидрофосфат натрия, моногидрат.

Кристаллы или гранулы белого цвета, слегка расплывающиеся на воздухе.

Легко растворим в воде, практически нерастворим в спирте 96 %.

Хранят в воздухонепроницаемой упаковке.

Натрия дигидрофосфат дигидрат. [13472-35-0]. $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$.

(М.м. 156,01). Дигидрофосфат натрия, дигидрат.

Бесцветные или белые кристаллы.

Растворим в горячей воде, нерастворим в спирте 96 %.

Натрия дигидрофосфата раствор 0,05 М.

6,900 г натрия дигидрофосфата моногидрата растворяют в достаточном количестве воды и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл.

Натрия дитионит. [7775-14-6]. $Na_2S_2O_4$. (М.м. 174,11).

Дитионит натрия.

Кристаллический порошок белого или серовато-белого цвета; на воздухе окисляется.

Очень легко растворим в воде, мало растворим в спирте 96 %.

Хранят в воздухонепроницаемой упаковке.

Натрия диэтилдитиокарбамат. [20624-25-3]. $C_5H_{10}NNaS_2 \cdot 3H_2O$.

(М.м. 225,31).

N,*N*-Диэтилдитиокарбамат натрия тригидрат.

Бесцветные или белого цвета кристаллы.

Легко растворим в воде, растворим в спирте 96 %. Водный раствор бесцветный.

Натрия додецилсульфат. См. **Натрия лаурилсульфат**.

Натрия докузат. [577-11-7]. $C_{20}H_{37}NaO_7S$. (М.м. 444,6).

1,2-Бис[(2-этилгексил)оксикарбонил]этансульфонат натрия.

Белая или почти белая воскообразная масса или хлопья; гигроскопичен.

Умеренно растворим в воде, легко растворим в спирте 96 % и метиленхлориде.

Натрия йодид. [7681-82-5]. NaI. (М.м. 149,89). Иодид натрия.

Белый кристаллический порошок или бесцветные кристаллы; гигроскопичен.

Очень легко растворим в воде, легко растворим в спирте 96 %.

Натрия карбонат безводный. [497-19-8]. Na_2CO_3. (М.м. 105,99). Карбонат натрия.

Порошок белого цвета, гигроскопичен.

Легко растворим в воде, практически нерастворим в спирте 96 %.

Потеря в массе при высушивании при температуре около 300 °С должна быть не более 1 %.

Хранят в воздухонепроницаемой упаковке.

Натрия карбонат декагидрат. [6132-02-1]. $Na_2CO_3 \cdot 10H_2O$. (М.м. 286,14).

Карбонат натрия, декагидрат.

Белый кристаллический порошок или бесцветные прозрачные кристаллы. Легко растворим в воде, практически нерастворим в спирте 96 %.

Натрия карбоната раствор 20 %.

20,0 г натрия карбоната безводного растворяют в воде и доводят объём раствора водой до 100,0 мл. Срок годности раствора 2 мес.

Натрия карбоната раствор 10,6 %. Раствор 106 г/л натрия карбоната безводного.

10,6 г натрия карбоната безводного растворяют в воде и доводят объём раствора водой до 100,0 мл. Срок годности раствора 2 мес.

Натрия карбоната раствор 10 %.

10,0 г натрия карбоната безводного растворяют в воде и доводят объём раствора водой до 100,0 мл.

Срок годности раствора не более 30 сут при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Натрия карбоната раствор 5 %. 5,0 г натрия карбоната безводного растворяют в воде и доводят объём раствора водой до 100,0 мл.

Срок годности раствора не более 30 сут при хранении в прохладном, защищённом от света месте.

Натрия карбоната раствор 2 %.

2,0 г натрия карбоната безводного растворяют в воде, свободной от углерода диоксида, и доводят объём раствора водой до 100,0 мл.

Срок годности раствора не более 14 сут при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Натрия карбоната раствор 1,85 %.

1,85 г натрия карбоната безводного растворяют в воде, свободной от углерода диоксида, и доводят объём раствора водой до 100,0 мл.

Срок годности раствора не более 14 сут при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Натрия карбоната раствор 0,5 %.

0,5 г натрия карбоната безводного растворяют в воде, свободной от углерода диоксида, и доводят объём раствора водой до 100,0 мл.

Срок годности раствора не более 7 сут при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Натрия карбоната раствор 2 % в натрия гидроксиде.

Раствор 20 г/л натрия карбоната безводного в 0,1 М растворе натрия гидроксида.

Натрия карбоната раствор 0,1 М.

10,6 г натрия карбоната безводного растворяют в воде и доводят объём раствора тем же растворителем до 1000,0 мл.

Срок годности раствора не более 7 сут при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Натрия карбоната раствор 0,05 М.

5,3 г натрия карбоната безводного растворяют в воде и доводят объём раствора тем же растворителем до 1000,0 мл.

Срок годности раствора не более 7 сут при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Натрия кобальтинитрит. [13600-98-1]. $Na_3[Co(NO_2)_6]$. (М.м. 403,9).

Гексанитрокобальтат(III) натрия.

Порошок оранжево-желтого цвета.

Легко растворим в воде, мало растворим в спирте 96 %.

Натрия кобальтинитрит полугидрат. $Na_3[Co(NO_2)_6]\cdot 0{,}5H_2O$. (М.м. 412,9).

Гексанитрокобальтат(III) натрия, гемигидрат.

Оранжево-желтый порошок.

Растворим в воде и в кислотах.

Натрия кобальтинитрита раствор 10 %.

Раствор 100 г/л. Растворять при комнатной температуре.

Готовят непосредственно перед использованием.

Натрия кобальтинитрита раствор 20 %.

Раствор 200 г/л. Растворять при комнатной температуре.

Готовят непосредственно перед использованием.

Натрия лаурилсульфат. [151-21-3]. $C_{12}H_{25}NaO_4S$. (М.м. 288,38).

Додецил-1-сульфат натрия.

Белый или светло-желтый порошок или кристаллы.

Легко растворим в воде с образованием опалесцирующего раствора, умеренно растворим в спирте 96 %.

Буферный рабочий раствор для электрофореза в системе натрия лаурилсульфат-полиакриламидный гель (SDS-PAGE).

151,4 г трис(гидроксиметил)аминометана, 721,0 г глицина и 50,0 г натрия лаурилсульфата растворяют в воде и доводят тем же растворителем до 5000,0 мл. Непосредственно перед использованием разводят водой в 10 раз и перемешивают.

pH полученного раствора должен быть от 8,1 до 8,8.

Буферный образцовый раствор (концентрированный) для электрофореза в системе натрия лаурилсульфат – полиакриламидный гель (SDS-PAGE).

1,89 г трис(гидроксиметил)аминометана, 5,0 г натрия лаурилсульфата, 50 мг бромфенолового синего и 25,0 мл глицерина растворяют в 100 мл воды, доводят pH раствора до 6,8 хлористоводородной кислотой концентрированной и доводят водой до 125 мл.

Буферный образцовый раствор (концентрированный) для электрофореза в системе натрия лаурилсульфат – полиакриламидный гель (SDS-PAGE) для восстановительных условий.

3,78 г трис(гидроксиметил)аминометана, 10,0 г натрия лаурилсульфата, 100 мг бромфенолового синего и 50,0 мл глицерина растворяют в 200 мл воды. К полученному раствору прибавляют 25,0 мл 2-меркаптоэтанола, доводят pH раствора до 6,8 хлористоводородной кислотой концентрированной и доводят объём раствора водой до 250,0 мл.

Альтернативно в качестве восстанавливающего вещества вместо 2-меркаптоэтанола может быть использован дитиотреитол. В этом случае буферный раствор готовят следующим образом: 3,78 г трис(гидроксиметил)-аминометана, 10,0 г натрия лаурилсульфата, 100 мг бромфенилового синего и 50,0 мл глицерина растворяют в 200 мл воды. Доводят pH раствора до 6,8 хлористоводородной кислотой концентрированной и доводят объём раствора водой до 250,0 мл. Непосредственно перед использованием прибавляют дитиотреитол до конечной концентрации 100 мМ.

Натрия метабисульфит. [7681-57-4]. $Na_2S_2O_5$. (М.м. 190,11).

Дисульфит натрия.

Белый или почти белый кристаллический порошок.

Легко растворим в воде, умеренно растворим в спирте 96 %.

Натрия метабисульфита раствор 20 %.

20 г натрия метабисульфита растворяют в воде и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл.

Раствор хранят в таре из темного стекла с притертой пробкой при комнатной температуре в течение 6 мес.

Натрия метабисульфита раствор 0,5 %.

0,5 г натрия метабисульфита растворяют в воде и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл.

Раствор используют свежеприготовленным.

Натрия метансульфонат. [2386-57-4]. CH_3NaO_3S. (М.м. 118,09).

Метансульфонат натрия.

Кристаллический порошок белого цвета, гигроскопичен.

Легко растворим в воде, растворим в спирте 96 %.

Хранят в воздухонепроницаемой упаковке.

Натрия метаперйодат. См. **Натрия перйодат**.

Натрия метилат. [124-41-4]. CH_3ONa. (М.м. 54,02).

Метоксид натрия.

Белый порошок. Легко воспламеняем. Чувствителен к влажности.

Активно реагирует с водой.

Хранят во влаго- и воздухонепроницаемой упаковке.

Натрия молибдат. [10102-40-6]. $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$. (М.м. 241,95).

Молибдат(VI) натрия, дигидрат.

Кристаллический порошок белого цвета или бесцветные кристаллы.

Легко растворим в воде.

Натрия нафтохинонсульфонат. [521-24-4]. $C_{10}H_5NaO_5S$. (М.м. 260,20).

1,2-Диоксо-1,2-дигидронафталин-4-сульфонат натрия.

Кристаллический порошок от желтого до оранжево-желтого цвета.

Легко растворим в воде, практически нерастворим в спирте 96 %.

Натрия нитрат. [7631-99-4]. $NaNO_3$. (М.м. 84,99). Нитрат натрия.

Порошок или гранулы белого цвета или бесцветные, прозрачные, кристаллы, расплывающиеся на воздухе.

Легко растворим в воде, мало растворим в спирте 96 %.

Хранят в воздухонепроницаемой упаковке.

Натрия нитрит. [7632-00-0]. $NaNO_2$. (М.м. 69,00). Нитрит натрия.

Гранулированный порошок белого цвета или кристаллический порошок слегка желтоватого цвета.

Легко растворим в воде.

Натрия нитрита раствор 25 %. Раствор 250 г/л.

Готовят непосредственно перед использованием.

Натрия нитрита раствор 10 %. Раствор 100 г/л.

Готовят непосредственно перед использованием.

Натрия нитрита раствор 5 %. Раствор 50 г/л.

Готовят непосредственно перед использованием.

Натрия нитрита раствор 1 %. Раствор 10 г/л.

Готовят непосредственно перед использованием.

Натрия нитрита раствор 0,5 %. Раствор 5 г/л.

Готовят непосредственно перед использованием.

Натрия нитрита раствор 0,2 %. Раствор 2 г/л.

Готовят непосредственно перед использованием.

Натрия нитропруссид. [13755-38-9]. $Na_2[Fe(CN)_5(NO)]\cdot 2H_2O$. (М.м. 297,95).

Пентацианонитрозилферрат(III) натрия, дигидрат.

Порошок или кристаллы красновато-коричневого цвета.

Легко растворим в воде, мало растворим в спирте 96 %.

Натрия нитропруссида раствор 10 % в серной кислоте разведённой 9,8 %. 1 г натрия нитропруссида помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл. растворяют в серной кислоте разведённой 9,8 % и доводят объём тем же растворителем до метки.

Натрия нитропруссида раствор 10 %.

10,0 г натрия нитропруссида растворяют в воде и доводят объём раствора водой до 100 мл.

Натрия нитропруссида раствор 5 %.

5,0 г натрия нитропруссида растворяют в воде и доводят объём раствора водой до 100 мл.

Натрия нитропруссида раствор 4 %.

4,0 г натрия нитропруссида растворяют в воде и доводят объём раствора водой до 100 мл.

Натрия нитропруссида раствор 1 %.

1,0 г натрия нитропруссида растворяют в воде и доводят объём раствора водой до 100 мл.

Натрия нитропруссида окисленный раствор.

10 г натрия нитропруссида растворяют в 100 мл воды, прибавляют 5 мл 3 % раствора калия перманганата и 2 мл 10 % раствора натрия гидроксида. Полученную смесь фильтруют и выдерживают в течение 24 ч.

Срок годности 2 мес.

Натрия оксалат. [62-76-0]. $C_2Na_2O_4$. (М.м. 134,00).

Оксалат динатрия.

Кристаллический порошок белого цвета.

Растворим в воде, практически нерастворим в спирте 96 % и эфире.

Натрия октансульфонат. [5324-84-5]. $C_8H_{17}NaO_3S$. (М.м. 216,27).

Октан-1-сульфонат натрия.

Содержит не менее 98 % $C_8H_{17}NaO_3S$.

Кристаллический порошок или хлопья белого или почти белого цвета.

Легко растворим в воде, растворим в метаноле.

Натрия октилсульфат. [142-31-4]. $C_8H_{17}NaO_4S$. (М.м. 232,27).

Октилсульфат натрия.

Кристаллический порошок или хлопья белого или почти белого цвета.

Легко растворим в воде, растворим в метаноле.

Натрия пентансульфонат. [22767-49-3]. $C_5H_{11}NaO_3S$. (М.м. 174,19).

Пентан-1-сульфонат натрия.

Твердое кристаллическое вещество белого или почти белого цвета.

Растворим в воде и спирте 96 %.

Натрия пентансульфоната моногидрат. [207605-40-1].$C_5H_{11}NaO_3S \cdot H_2O$. (М.м. 192,21).

Пентан-1-сульфонат натрия моногидрат.

Белое или почти белое кристаллическое вещество, растворимо в воде.

Натрия перйодат. [7790-28-5]. $NaIO_4$. (М.м. 213,89).

Периодат натрия.

Содержит не менее 99,0 % $NaIO_4$.

Кристаллический порошок или кристаллы белого цвета.

Растворим в воде и растворах неорганических кислот.

Натрия перйодата раствор.

1,07 г натрия перйодата растворяют в воде, прибавляют 5 мл серной кислоты разведённой 9,8 % и доводят объём раствора водой до 100,0 мл.

Готовят непосредственно перед использованием.

Натрия перхлорат. [7791-07-3]. $NaClO_4 \cdot H_2O$. (М.м. 140,46).

Перхлорат натрия, моногидрат.

Содержит не менее 99,0 % $NaClO_4 \cdot H_2O$.

Кристаллы белого цвета, расплывающиеся на воздухе.

Очень легко растворим в воде.

Хранят в плотно закрытой упаковке.

Натрия пикрата раствор.

1,8 г пикриновой кислоты растворяют в 180 мл воды и прибавляют 20 мл 10 % раствора натрия гидроксида. Используют свежеприготовленным.

Натрия пикрата нейтральный раствор.

1,0 г пикриновой кислоты растворяют в 25 мл воды, 4,36 мл 1 М раствора натрия гидроксида и доводят объём раствора водой до 100,0 мл. 5 мл полученного раствора титруют 0,1 М раствором натрия гидроксида или 0,1 М раствором хлористоводородной кислоты (индикатор – фенолфталеин).

В случае получения щелочного или кислого раствора натрия пикрата к нему прибавляют по расчету 0,1 М раствор натрия гидроксида или 0,1 М раствора хлористоводородной кислоты.

Натрия пикрата щелочной раствор.

Смешивают 20 мл раствора натрия пикрата и 10 мл раствора 50 г/л натрия гидроксида, доводят объём раствора водой до 100,0 мл.

Срок годности 2 сут.

Натрий пиросернистокислый. **Натрия пиросульфат**. См. **Натрия метабисульфит**.

Натрия пирофосфат. [13472-36-1]. $Na_4P_2O_7 \cdot 10H_2O$. (М.м. 446,1).

Дифосфат тетранатрия, декагидрат.

Бесцветные, слегка выветривающиеся кристаллы.

Легко растворим в воде, очень легко растворим в спирте 96 %.

Натрия родизонат. [523-21-7]. $C_6Na_2O_6$. (М.м. 214,04).

3,4,5,6-Тетраоксоциклогекс-1-ен-1,2-диолат динатрия.

Кристаллы фиолетового цвета.

Растворим в воде с образованием оранжево-желтого раствора. Растворы нестабильны, их готовят в день использования.

Натрия салицилат. [54-21-7]. $C_7H_5NaO_3$. (М.м. 160,10).

Белый кристаллический порошок или белые чешуйки.

Легко растворим в воде, умеренно растворим в спирте 96 %, практически нерастворим в эфире.

Натрия салицилата раствор 1,15 %.

1,15 г натрия салицилата растворяют в воде и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл.

Натрия сульфат. [7727-73-3]. $Na_2SO_4 \cdot 10H_2O$. (М.м. 322,20).

Сульфат динатрия, декагидрат.

Бесцветные прозрачные, выветривающиеся на воздухе кристаллы или белый кристаллический порошок.

Легко растворим в воде, практически нерастворим в спирте 96 %.

Натрия сульфата насыщенный раствор.

60 г натрия сульфата заливают 100 мл воды и выдерживают при частом взбалтывании в течение 24 ч.

Натрия сульфата раствор 20 %.

20 г натрия сульфата растворяют в воде и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл.

Натрия сульфат безводный. [7757-82-6]. Na_2SO_4. (М.м. 142,04). Сульфат натрия.

Белый порошок. Гигроскопичен. Очень легко растворим в воде.

Потеря в массе при высушивании. Не более 0,5 %. Определение проводят при температуре 130 °С.

Натрия сульфид. [1313-84-4]. $Na_2S \cdot 9H_2O$. (М.м. 240,18). Сульфид натрия, нонагидрат.

Бесцветные, быстро желтеющие кристаллы, расплывающиеся на воздухе. Очень легко растворим в воде.

Хранят в воздухонепроницаемой упаковке.

Натрия сульфида раствор в глицерине.

12 г натрия сульфида растворяют при нагревании в 45 мл смеси растворителей вода – глицерин (85 %) 10:29, затем охлаждают и доводят объём раствора той же смесью растворителей до 100,0 мл.

Раствор должен быть бесцветным.

Натрия сульфида водно-глицериновый раствор.

5 г натрия сульфида растворяют в 10 мл воды и прибавляют 30 мл глицерина.

Хранят в закрытой упаковке, защищая от света.

Натрия сульфида раствор 2 %.

2 г натрия сульфида растворяют в воде, прибавляют 2 – 3 капли глицерина и доводят объём раствора водой до 100,0 мл.

Натрия сульфит. [10102-15-5]. $Na_2SO_3 \cdot 7H_2O$. (М.м. 252,15). Сульфит натрия, гептагидрат.

Бесцветные кристаллы. На воздухе легко теряет воду и окисляется.

Легко растворим в воде, очень мало растворим в спирте 96 %.

Натрия сульфита раствор 30 %.

30 г натрия сульфита растворяют в воде и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл.

Натрия сульфита раствор 4 %.

4,0 г натрия сульфита растворяют в воде и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл.

Натрия сульфит безводный. [7757-83-7]. Na_2SO_3. (М.м. 126,04). Сульфит натрия.

Белый порошок.

Легко растворим в воде, очень мало растворим в спирте 96 %.

Натрия тартрат. [6106-24-7]. $C_4H_4Na_2O_6 \cdot 2H_2O$. (М.м. 230,08).

(2*R*,3*R*)-2,3-Дигидроксибутан-1,4-диоат динатрия, дигидрат.

Кристаллы или гранулы белого цвета.

Очень легко растворим в воде, практически нерастворим в спирте 96 %.

Натрия тартрата раствор 2,98 %. 2,98 г натрия тартрата помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в воде и доводят объём раствора водой до метки.

Натрия тетраборат. [1330-43-4]. $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$. (М.м. 381,37).

Тетраборат натрия, декагидрат.

Бесцветные прозрачные, легко выветривающиеся кристаллы или белый кристаллический порошок.

Умеренно растворим в холодной воде, легко растворим в горячей воде, растворим в глицерине, практически нерастворим в спирте 96 %.

Натрия тетрабората раствор.

9,55 г динатрия тетрабората растворяют в серной кислоте концентрированной при нагревании и доводят объём раствора той же кислотой до 1000,0 мл.

Натрия тетрабората насыщенный раствор.

5,0 г мелко растертого натрия тетрабората заливают 100 мл воды и оставляют при частом взбалтывании в течение 24 ч. Раствор фильтруют.

Натрия тетрабората раствор 0,05 М.

Натрия тетраборат дважды перекристаллизовывают из воды, растворяя его при температуре не выше 60 °С, и сушат между листами фильтровальной бумаги, меняя последнюю до тех пор, пока отдельные кристаллы не перестанут прилипать к стеклянной палочке.

19,07 г перекристаллизованного натрия тетрабората растворяют в воде и доводят объём раствора тем же растворителем до 1000,0 мл.

Натрия тетрадейтеродиметилсилапентаноат. [24493-21-8]. $C_6H_9D_4NaO_2Si$. (М.м. 172,27).

3-(Триметилсилил)пропаноат-2,2,3,3-d_4 натрия.

Степень дейтерирования не менее 99 %.

Кристаллический порошок белого цвета.

Легко растворим в воде, этаноле и метаноле.

Температура плавления. Около 300 °С.

Вода и дейтерия оксид. Не более 0,5 %.

Натрия тетрафенилборат. [143-66-8]. $C_{24}H_{20}BNa$. (М.м. 342,20).

Тетрафенилборанид натрия.

Объёмный порошок белого или слегка желтоватого цвета.

Легко растворим в воде и ацетоне.

Натрия тетрафенилбората раствор 1 %. Раствор 10 г/л.

Если необходимо, перед использованием фильтруют.

Срок годности 7 сут.

Натрия тиогликолят. [367-51-1]. $C_2H_3NaO_2S$. (М.м. 114,10).

Сульфанилацетат натрия.

Гранулированный порошок или кристаллы белого цвета. Гигроскопичен.

Легко растворим в воде и метаноле, растворим в спирте 96 %.

Хранят в воздухонепроницаемой упаковке.

Натрия тиосульфат. [10102-17-7]. $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$. (М.м. 248,18).

Тиосульфат динатрия, пентагидрат.

Бесцветные прозрачные кристаллы.

Очень легко растворим в воде, практически нерастворим в спирте 96 %.

Натрия тиосульфата раствор 1 М.

248,2 г натрия тиосульфата растворяют в воде и доводят объём раствора тем же растворителем до 1000,0 мл.

Раствор хранят в таре из темного стекла с притертой пробкой при комнатной температуре в течение 3 мес.

Натрия тиосульфата раствор 0,1 М.

24,82 г натрия тиосульфата растворяют в воде и доводят объём раствора тем же растворителем до 1000,0 мл.

Раствор хранят в таре из темного стекла с притертой пробкой при комнатной температуре в течение 3 мес.

Натрия тиосульфата раствор 0,005 М.

25,0 мл натрия тиосульфата раствора 0,1 М помещают в мерную колбу вместимостью 500 мл и доводят объём раствора водой до метки.

Раствор используют свежеприготовленным.

Натрия флуоресцеинат. [518-47-8]. $C_{20}H_{10}Na_2O_5$. (М.м. 376,27).

2-(6-Оксидо-3-оксо-3*H*-ксантен-9-ил)бензоат динатрия.

Порошок оранжево-красного цвета.

Легко растворим в воде. Водные растворы имеют интенсивную желтовато-зеленую флуоресценцию.

Натрия формиат. [141-53-7]. $CHNaO_2$. (М.м. 68,01). Формиат натрия.

Кристаллический порошок или расплывающиеся гранулы белого цвета.

Растворим в воде и глицерине, мало растворим в спирте 96 %.

Температура плавления. Около 253 °С.

Натрия фосфат двузамещенный безводный. См. **Динатрия гидрофосфат безводный**.

Натрия фосфата раствор 5 %. См. **Динатрия гидрофосфата безводного раствор 5 %**.

Натрия фосфат двузамещенный 12-водный. См. **Динатрия гидрофосфат додекагидрат**.

Натрия фосфат додекагидрат. [10101-89-0]. $Na_3PO_4 \cdot 12H_2O$. (М.м. 380,12). Фосфат натрия, додекагидрат.

Бесцветные или белого цвета кристаллы.

Легко растворим в воде.

Натрия фосфата раствор 0,25 М.

95,025 г натрия фосфата додекагидрата растворяют в воде и доводят объём раствора тем же растворителем до 1000,0 мл.

Натрия фосфат однозамещенный. См. **Натрия дигидрофосфат дигидрат**.

Натрий фосфорнокислый двузамещенный 12-водный. См. **Динатрия гидрофосфат додекагидрат**.

Натрий фосфорнокислый двузамещенный безводный. См. **Динатрия гидрофосфат безводный**.

Натрия фосфорномолибдат. [1313-30-0] $Na_3[P(Mo_3O_{10})_4] \cdot xH_2O$. (М.м. 1891,2 для безводного).

Натрий фосфорномолибденовокислый.

Желтый мелкокристаллический порошок.

Растворим в растворах неорганических кислот.

Натрия фосфорномолибдата раствор 10 %.

10 г натрия фосфорномолибдата растворяют в 75,6 мл хлористоводородной кислоты концентрированной.

Натрия фторид. [7681-49-4]. NaF. (М.м. 41,99). Фторид натрия.

Белый порошок или бесцветные кристаллы.

Растворим в воде, практически нерастворим в спирте 96 %.

Натрия хлорид. [7647-14-5]. NaCl. (М.м. 58,44). Хлорид натрия.

Белые кубические кристаллы или белый кристаллический порошок.

Очень легко растворим в воде; практически нерастворим в спирте 96 %.

Натрия хлорида раствор 20 %. Раствор 200 г/л.

Натрия хлорида раствор 10 %. Раствор 100 г/л.

Натрия хлорида раствор 5 %. Раствор 50 г/л.

Натрия хлорида раствор 1 %. Раствор 10 г/л.

Натрия хлорида раствор 0,9 %. Раствор 9 г/л.

При необходимости приготовление раствора проводят в асептических условиях.

Натрия хлорида раствор 0,1 %. Раствор 1,0 г/л.

Натрия хлорида раствор 0,2 М. 11,7 г натрия хлорида помещают в мерную колбу вместимостью 1 л, растворяют в воде и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

Натрия хлорида насыщенный раствор.

1 часть натрия хлорида смешивают с 2 частями воды, периодически встряхивают и отстаивают. Перед использованием раствор декантируют и, если необходимо, фильтруют.

Натрия цитрат. [6132-04-3]. $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$. (М.м. 294,10).

Тринатриевая соль 2-гидроксипропан-1,2,3-карбоновой кислоты, дигидрат.

Белый кристаллический порошок.

Легко растворим в воде, практически нерастворим в спирте 96 %.

Натрий щавелевокислый. См. **Натрия оксалат**.

Натрия эдетат. См. **Натрия эдетат дигидрат**.

Натрия эдетат дигидрат. [6381-92-6]. $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$. (М.м. 372,24).

2,2',2",2'"-(Этан-1,2-диилдинитрило)тетраацетат динатрия дигидрат.

Белый, кристаллический порошок.

Растворим в воде, умеренно растворим в спирте 96 %, практически нерастворим в эфире.

Натрия эдетата раствор 1 М.

37,2 г натрия эдетата дигидрата растворяют в воде и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл.

Натрия эдетата раствор 0,1 М.

3,72 г натрия эдетата дигидрата растворяют в воде и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл.

Натрия эдетата раствор 0,8 %.

0,89 г натрия эдетата дигидрата растворяют в воде и доводят объём раствора водой до 100 мл.

Натронная известь. [8006-28-8]. CaO·NaOH. (М.м. 96,07).

Оксид кальция—гидроксид натрия (1/1)

Нафталин. [91-20-3]. $C_{10}H_8$. (М.м. 128,17). Нафталин.

Кристаллы белого цвета.

Практически нерастворим в воде, легко растворим в эфире, растворим в спирте 96 %.

Температура плавления. Около 80 °С.

Нафталин, используемый для жидкостной сцинтилляции, должен быть соответствующей степени чистоты.

Нафтарзон. [3688-92-4]. $C_{16}H_{11}AsN_2Na_2O_{10}S_2$. (М.м. 576,3).

4-[(2-Арсонофенил)диазенил]-3-гидроксинафталин-2,7-дисульфонат динатрия.

Порошок красного цвета. Растворим в воде.

Нафтарзона раствор 0,058 %. Раствор 0,58 г/л.

Испытание на чувствительность. К 50 мл спирта 96 % прибавляют 20 мл воды, 1 мл 0,05 М раствора серной кислоты, 1 мл раствора нафтарзона и титруют 0,025 М раствором бария перхлората до перехода окраски раствора от оранжево-желтой к оранжево-розовой.

Хранят в защищенном от света месте. Срок хранения 7 сут.

Нафтиламин. [134-32-7]. $C_{10}H_9N$. (М.м. 143,19).

Нафталин-1-амин.

Кристаллический порошок белого цвета, под действием света и воздуха розовеет.

Мало растворим в воде, легко растворим в спирте 96 % и эфире.

Температура плавления. Около 51 °С.

Хранят в защищенном от света месте.

β-Нафтиламин. **[**91-59-8]. $C_{10}H_9N$. (М.м. 143,19).

Нафталин-2-амин.

Листовидные кристаллы или кристаллический порошок.

Растворим в спирте 96 %, эфире и бензоле.

Температура плавления. Около 110 °С.

Ядовит.

1-Нафтиламин-7-сульфоновая кислота. [119-28-8]. $C_{10}H_9NO_3S$. (М.м. 223,25).

8-Аминонафталин-7-сульфоновая кислота.

Содержит не менее 95 % $C_{12}H_{10}O_2$.

1-Нафтилуксусная кислота. [86-87-3]. $C_{12}H_{10}O_2$. (М.м. 186,21).

(Нафталин-1-ил)уксусная кислота.

Содержит не менее 95 % $C_{12}H_{10}O_2$.

Порошок белого или желтоватого цвета.

Мало растворима в воде, растворима в разведённых растворах гидроксидов щелочных металлов.

Температура плавления. Около 135 °С.

Нафтилэтилендиамина дигидрохлорид. [1465-25-4]. $C_{12}H_{14}N_2 \cdot 2HCl$. (М.м. 259,17).

N-(Нафталин-1-ил)этан-1,2-диамина дигидрохлорид.

Может содержать кристаллизационный метанол.

Порошок белого или желтовато-белого цвета.

Растворим в воде, мало растворим в спирте 96 %.

Раствор нафтилэтилендиамина дигидрохлорида 0,5 % в 1 М хлористоводородной кислоте.

0,5 г нафтилэтилендиамина дигидрохлорида растворяют в 1 М хлористоводородной кислоте и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл.

Используют свежеприготовленным.

Нафтилэтилендиамина дигидрохлорида раствор 0,1 %.

0,1 г нафтилэтилендиамина дигидрохлорида растворяют в воде и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл.

Используют свежеприготовленным.

1-Нафтойная кислота. [86-55-5]. $C_{11}H_8O_2$. (М.м. 172,18).

Нафталин-1-карбоновая кислота.

Содержит не менее 98 % $C_{11}H_8O_2$.

Лекго растворима в горячем спирте 96 % и эфире, мало растворима в воде.

Температура плавления. 160–162 °С.

α-Нафтол. [90-15-3]. $C_{10}H_8O$. (М.м. 144,17). Нафталин-1-ол.

Кристаллический порошок белого цвета или бесцветные или белого цвета кристаллы, темнеющие под действием света.

Мало растворим в воде, легко растворим в спирте 96 % и эфире.

Температура плавления. Около 95 °С.

Хранят в защищенном от света месте.

α-Нафтола раствор 0,1 %.

0,10 г α-нафтола растворяют в 3 мл 15 % раствора натрия гидроксида и доводят объём раствора водой до 100,0 мл.

Готовят непосредственно перед использованием.

α-Нафтола спиртовой раствор 0,05 %.

0,05 г α-нафтола растворяют в спирте 40 % и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл.

α-Нафтола спиртовой раствор 20 %.

20 г α-нафтола растворяют в спирте 96 % и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл.

β-Нафтол. [135-19-3]. $C_{10}H_8O$. (М.м. 144,17). Нафталин-2-ол.

Пластинки или кристаллы белого или слабо-розового цвета.

Очень мало растворим в воде, очень легко растворим спирте 96 %.

Температура плавления. Около 122 °С.

Хранят в защищенном от света месте.

β-Нафтола щелочной раствор 5 %.

5 г свежеперекристаллизованного β-нафтола растворяют в 40 мл натрия гидроксида раствора 10 % и доводят объём раствора водой до 100,0 мл.

Готовят непосредственно перед использованием.

β-Нафтола щелочной раствор 2 %.

2 г β-нафтола растворяют в 40 мл натрия гидроксида раствора 10 % и доводят объём раствора водой до 100,0 мл.

Готовят непосредственно перед использованием.

β-Нафтола раствор 0,003 % в серной кислоте.

3,0 мг β-нафтола растворяют в 50 мл серной кислоты концентрированной и доводят объём раствора той же кислотой до 100,0 мл.

Готовят непосредственно перед использованием.

Нафтолбензеин. [145-50-6]. $C_{27}H_{18}O_2$. (М.м. 374,43).

4-[(4-Гидроксинафталин-1-ил)(фенил)метилен]нафталин-1(4*H*)-он.

Порошок коричневато-красного цвета или блестящие кристаллы коричневато-черного цвета.

Практически нерастворим в воде, растворим в спирте 96 % и уксусной кислоте ледяной.

Нафтолбензеина раствор 0,2 %. Раствор 2 г/л в уксусной кислоте безводной.

Испытание на чувствительность. К 50 мл уксусной кислоты ледяной прибавляют 0,25 мл раствора нафтолбензеина; появляется коричневато-желтое окрашивание, которое должно перейти в зеленое при прибавлении не более 0,05 мл 0,1 М раствора хлорной кислоты.

α-Нафтолфталеин. [596-01-0]. $C_{28}H_{18}O_4$. (М.м. 418,4).

3,3-Бис(4-гидроксинафталин-1-ил)-2-бензофуран-1(3*H*)-он.

Мелкокристаллический порошок от зеленовато-серого до коричневого цвета.

Практически нерастворим в воде, легко растворим в спирте, эфире и уксусной кислоте ледяной, мало растворим в бензоле.

Переход окраски раствора от желтовато-розовой к зеленовато-синей в интервале pH 7,4 – 8,6.

α-Нафтолфталеина раствор 0,1 %.

0,1 г α-нафтолфталеина растворяют в 50 мл спирта 96 % и доводят объём раствора водой до 100,0 мл.

1,2-Нафтохинон-4-сульфокислоты калиевая соль. См. **Калия нафтохинонсульфонат**.

Нейтральный красный. [553-24-2]. $C_{15}H_{17}ClN_4$. (М.м. 288,78).

8-Амино-*N*,*N*,7-триметилфеназин-2(10*H*)-иминий хлорид.

Кристаллы или порошок черного или черно-зеленого цвета.

Легко растворим в воде, растворим в спирте 96 %.

Переход окраски раствора от красной к желтой в интервале pH 6,8 – 8,0.

Нейтрального красного раствор. 0,1 или 0,5 % (для нитритометрии) раствор.

Нейтрального красного уксуснокислый раствор. 0,1 % раствор в уксусной кислоте ледяной.

Нерилацетат. [141-12-8]. $C_{12}H_{20}O_2$. (М.м. 196,29). [(2Z)-3,7-Диметилокта-2,6-диен-1-ил]ацетат.

Бесцветная, маслянистая жидкость.

Смешивается с этанолом и эфиром.

d_{20}^{20}. Около 0,907.

n_D^{20}. Около 1,460.

Хроматографическая чистота нерилацетата, используемого в газовой хроматографии, должна быть не менее 93,0 %.

***транс*-Неролидол**. [40716-66-3]. $C_{15}H_{26}O$. (М.м. 222,37).

(6*E*)-3,7,11-Триметилдодека-1,6,10-триен-3-ол.

Жидкость слабо-желтого цвета с легким запахом лилии или ландыша.

Практически нерастворим в воде и глицерине, смешивается со спиртом 96 %.

d_{20}^{20}. Около 0,876.

n_D^{20}. Около 1,479.

Хроматографическая чистота *транс*-неролидола, используемого в газовой хроматографии, должна быть не менее 90,0 %.

Никель-алюминиевый сплав.

Содержит от 48 до 52 % алюминия (Al, А.м. 26,98) и от 48 до 52 % никеля (Ni, А.м. 58,69).

Перед использованием измельчают до тонкого порошка (сито № 180).

Практически нерастворим в воде, растворим в растворах неорганических кислот.

Никель-алюминиевый сплав, свободный от галогенов.

Содержит от 48 до 52 % алюминия (Al, А.м. 26,98) и от 48 до 52 % никеля (Ni, А.м. 58,69).

Мелкий порошок серого цвета.

Практически нерастворим в воде, растворим в растворах неорганических кислот.

Никеля сульфат. [10101-98-1]. $NiSO_4 \cdot 7H_2O$. (М.м. 280,86).

Сульфат никеля(II), гептагидрат.

Кристаллический порошок или кристаллы зеленого цвета.

Легко растворим в воде, мало растворим в спирте 96 %.

Никеля хлорид. [7718-54-9]. $NiCl_2$. (М.м. 129,60). Хлорид никеля(II).

Кристаллический порошок желтого цвета.

Очень легко растворим в воде, растворим в спирте 96 %. Сублимируется в отсутствие воздуха и легко абсорбирует аммиак. Водный раствор имеет кислую реакцию.

Никотиновая кислота. [59-67-6]. $C_6H_5NO_2$. (М.м. 123,11).

Пиридин-3-карбоновая кислота.

Белый или почти белый кристаллический порошок.

Умеренно растворим в воде, растворим в кипящей воде и кипящем спирте 96 %.

Никотинамидадениндинуклеотид. [53-84-9]. $C_{21}H_{27}N_7O_{14}P_2$. (М.м. 663,4).

({[(2*R*,3*S*,4*R*,5*R*)-5-(6-Амино-9*H*-пурин-9-ил)-3,4-дигидроксиоксолан-2-ил]метокси}(гидрокси)фосфорил){[(2*R*,3*S*,4*R*,5*R*)-5-(3-карбамоил-1-ий-1-ил)-3,4-дигидроксиоксолан-2-ил]метил}фосфат.

Порошок белого цвета, сильно гигроскопичен. Легко растворим в воде.

Никотинамидадениндинуклеотида раствор 0,4 %.

40 мг никотинамидадениндинуклеотида растворяют в воде и доводят объём раствора тем же растворителем до 10,0 мл.

Готовят непосредственно перед использованием.

Нильский синий А. [3625-57-8]. $(C_{20}H_{19}N_3O)_2 \cdot H_2SO_4$. (М.м. 732,8). 5-Имино-*N*,*N*-диэтил-5*H*-бензо[*a*]феноксазин-9-амина сульфат (2:1).

Кристаллический порошок зеленого цвета с бронзовым блеском.

Умеренно растворим в спирте 96 %, уксусной кислоте ледяной и пиридине.

Раствор 0,005 г/л в спирте (50 %, о/о) имеет максимум поглощения при длине волны 640 нм.

Нильского синего А раствор 1 %. Раствор 10 г/л в уксусной кислоте безводной.

Испытание на чувствительность. К 50 мл уксусной кислоты безводной прибавляют 0,25 мл раствора нильского синего А; появляется голубое окрашивание, которое переходит в сине-зеленое при прибавлении не более 0,1 мл 0,1 М раствора хлорной кислоты.

Переход окраски от синей до красной в интервале pH 9,0 – 13,0.

Нингидрин. [485-47-2]. $C_9H_4O_3 \cdot H_2O$. (М.м. 178,14). 2,2-Дигидрокси-1*H*-инден-1,3(2*H*)-дион, моногидрат.

Кристаллический порошок белого или слегка желтого цвета. Ядовит.

Растворим в воде и спирте 96 %, мало растворим в эфире.

Хранят в защищенном от света месте.

Нингидрина и олова(II) хлорида реактив (1).

0,2 г нингидрина растворяют в 4 мл горячей воды, прибавляют 5 мл 0,16 % раствора олова(II) хлорида, выдерживают в течение 30 мин, фильтруют и хранят при температуре от 2 до 8 °С.

Непосредственно перед использованием к 2,5 мл полученного раствора прибавляют 5 мл воды и 45 мл 2-пропанола.

Нингидрина и олова(II) хлорида реактив (2).

4 г нингидрина растворяют в 100 мл моноэтилового эфира этиленгликоля. Осторожно встряхивают с 1 г смолы катионообменной (от 300 до 840 мкм) и фильтруют (раствор А). 0,16 г олова(II) хлорида растворяют в 100 мл буферного раствора pH 5,5 (раствор Б).

Непосредственно перед использованием смешивают равные объёмы растворов А и Б.

Нингидрина раствор 3 %.

3 г нингидрина растворяют в 100 мл раствора 45,5 г/л натрия метабисульфита.

Нингидрина раствор 0,4 %.

Раствор 4 г/л нингидрина в смеси растворителей уксусная кислота безводная – бутанол 5:95.

Нингидрина раствор 0,25 %.

0,25 г нингидрина растворяют в воде и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл.

Нингидрина раствор 0,25 % в спирте 96 %.

0,25 г нингидрина растворяют в спирте 96 % и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл.

Нингидрина раствор 0,2 %.

Раствор 2 г/л нингидрина в смеси растворителей уксусная кислота разведённая 12 % – бутанол 5:95.

Нингидрина раствор 0,1 %.

0,1 г нингидрина растворяют в воде и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл.

Используют свежеприготовленным.

Нингидрина раствор в ацетоне. 0,17 г нингидрина растворяют в 10 мл ацетона. Срок годности раствора - 30 сут. Хранить в плотно закрытой ёмкости при температуре от 0 до 4 °С.

Нингидрина спиртовой раствор.

1,0 г нингидрина растворяют в 50 мл спирта 96 % и прибавляют 10 мл уксусной кислоты ледяной.

Нитроанилин. [100-01-6]. $C_6H_6N_2O_2$ (М.м. 138,12).

4-Нитроанилин.

Кристаллический порошок ярко-желтого цвета.

Очень мало растворим в воде, умеренно растворим в кипящей воде, растворим в спирте 96 % и эфире. Образует водорастворимые соли с сильными неорганическими кислотами.

Температура плавления. Около 147 °С.

***п*-Нитроанилина раствор**.

0,015 г нитроанилина растворяют в 20 мл 0,1 М раствора хлористоводородной кислоты и доводят спиртом 96 % до 100,0 мл. Реактив применяют не ранее, чем через 24 ч после приготовления.

Нитробензальдегид. [552-89-6]. $C_7H_5NO_3$. (М.м. 151,12).

2-Нитробензальдегид.

Игольчатые кристаллы желтого цвета.

Мало растворим в воде, легко растворим в спирте 96 %, растворим в эфире, сублимируется паром.

Температура плавления. Около 42 °С.

Нитробензальдегидная бумага.

0,2 г нитробензальдегида растворяют в 10 мл 20 % раствора натрия гидроксида. Срок годности раствора 1 ч.

В полученный раствор погружают нижнюю половину полоски из медленно фильтрующей бумаги длиной 10 см и шириной 0,8 – 1,0 см. Избыток реактива удаляют, промокая полоску между 2 листами фильтровальной бумаги.

Используют в течение нескольких минут после приготовления.

Нитробензальдегида раствор.

0,12 г порошка нитробензальдегида прибавляют к 10 мл раствора натрия гидроксида разведённого 8,5 %, встряхивают в течение 10 мин и фильтруют. Готовят непосредственно перед использованием.

Нитробензилхлорид. [100-14-1]. $C_7H_6ClNO_2$. (М.м. 171,58).

1-Нитро-4-(хлорметил)бензол.

Кристаллы светло-желтого цвета. Вызывает слезотечение.

Практически нерастворим в воде, очень легко растворим в спирте 96 % и эфире.

Нитробензоилхлорид. [122-04-3]. $C_7H_4ClNO_3$. (М.м. 185,56).

4-Нитробензоилхлорид.

Кристаллы или кристаллическая масса желтого цвета, расплывающаяся на воздухе.

Растворим в растворе натрия гидроксида с образованием желтовато-оранжевого окрашивания.

Температура плавления. Около 72 °С.

4-(4-Нитробензил)пиридин. [1083-48-3]. $C_{12}H_{10}N_2O_2$. (М.м. 214,22).

4-[(4-Нитрофенил)метил]пиридин.

Порошок желтого цвета.

Температура плавления. Около 70 °С.

Нитробензол. [98-95-3]. $C_6H_5NO_2$. (М.м. 123,11).

Нитробензол.

Бесцветная или слегка желтоватого цвета жидкость.

Практически нерастворим в воде, смешивается со спиртом 96 % и эфиром.

Температура кипения. Около 211 °С.

Динитробензол. К 0,1 мл нитробензола прибавляют 5 мл ацетона, 5 мл воды и 5 мл 20 % раствора натрия гидроксида и встряхивают; после разделения слоев верхний слой должен быть почти бесцветным.

Нитрозодипропиламин. [621-64-7]. $C_6H_{14}N_2O$. (М.м. 130,19). *N*-Нитрозо-*N*-пропилпропан-1-амин.

Жидкость.

Растворим в этаноле, эфире и концентрированных неорганических кислотах.

d_{20}^{20}. Около 0,915.

Температура кипения. Около 78 °С.

Пригодна для определения хемилюминесценции.

Нитрозодипропиламина раствор.

Вводят 78,62 г этанола, прокалывая инъекционной иглой пробку сосуда, содержащего нитрозодипропиламин, разводят этанолом в соотношении 1:100 и помещают по 0,5 мл в плотно закрываемые флаконы.

Хранят в защищенном от света месте при температуре 5 °С.

Нитрозо-Р-соль. [525-05-3]. $C_{10}H_5NNa_2O_8S_2$. (М.м. 377,26).

3-Гидрокси-4-нитрозонафталин-2,7-дисульфонат динатрия.

Желтые или желтые с зеленоватым оттенком кристаллы.

Нитрозо-Р-соли раствор 0,5 %.

Раствор 0,1 г нитрозо-Р-соли в 50,0 мл воды.

Нитрометан. [75-52-5]. CH_3NO_2. (М.м. 61,04). Нитрометан.

Прозрачная, бесцветная, маслянистая жидкость.

Мало растворим в воде, смешивается со спиртом 96 % и эфиром.

d_{20}^{20}. От 1,132 до 1,134.

n_D^{20}. От 1,381 до 1,383.

Температурные пределы перегонки. От 100 до 103 °С; должно перегоняться не менее 95 %.

Нитромолибденованадиевый реактив.

Раствор I. 10,0 г аммония молибдата растворяют в воде, прибавляют 1 мл 18 % раствора аммиака и доводят объём раствора водой до 100,0 мл.

Раствор II. 2,5 г аммония ванадата растворяют в горячей воде, прибавляют 14 мл азотной кислоты концентрированной и доводят объём раствора водой до 500,0 мл.

К 96 мл азотной кислоты концентрированной прибавляют 100 мл раствора I и 100 мл раствора II и доводят объём раствора водой до 500,0 мл.

Нитротетразолиевый синий. [298-83-9]. $C_{40}H_{30}Cl_2N_{10}O_6$. (М.м. 817,6).

3,3′-(3,3′-Диметокси[1,1'-бифенил]-4,4′-диил)бис[2-(4-нитрофенил)-5-фенил-2*H*-тетразол-3-ий] дихлорид.

Кристаллы.

Растворим в метаноле с образованием прозрачного раствора желтого цвета.

Температура плавления. Около 189 °С с разложением.

4-Нитрофенол. [100-02-7]. $C_6H_5NO_3$. (М.м. 139,11).

4-Нитрофенол.

Бесцветный или слабо-желтый порошок, умеренно растворим в воде и метане.

Температура плавления. Около 114 °С.

Нитрофурантоин. [67-20-9]. $C_8H_6N_4O_5$. (М.м. 238,16).

1-{[(5-Нитрофуран-2-ил)метилен]амино}имидазолидин-2,4-дион.

Желтый кристаллический порошок или желтые кристаллы, без запаха или почти без запаха.

Очень мало растворим в воде и спирте 96 %, растворим в диметилформамиде.

(5-Нитро-2-фурил)метилена диацетат. [92-55-7]. $C_9H_9NO_7$. (М.м. 243,17).

[(5-Нитрофуран-2-ил)метилен]диацетат.

Кристаллы желтого цвета.

Температура плавления. Около 90 °С.

Нитрохромовый реактив.

0,7 г калия дихромата растворяют в азотной кислоте концентрированной и доводят объём раствора той же кислотой до 100,0 мл.

Нитроэтан. [79-24-3]. $C_2H_5NO_2$. (М.м. 75,07). Нитроэтан.

Прозрачная, бесцветная, маслянистая жидкость.

Растворим в воде, хлороформе; смешивается с этанолом и эфиром.

Температура кипения. Около 114 °С.

Нордазепам. [1088-11-5]. $C_{15}H_{11}ClN_2O$. (М.м. 270,71).

5-Фенил-7-хлор-1,3-дигидро-2*H*-1,4-бензодиазепин-2-он.

Кристаллический порошок белого или светло-желтого цвета.

Практически нерастворим в воде, мало растворим в спирте 96 %.

Температура плавления. Около 216 °С.

DL-Норлейцин. [616-06-8]. $C_6H_{13}NO_2$. (М.м. 131,17).

(2*RS*)-2-Аминогексановая кислота.

Блестящие кристаллы.

Умеренно растворим в воде, растворим в кислотах.

Норпсевдоэфедрина гидрохлорид. [2153-98-2]. $C_9H_{13}NO \cdot HCl$. (М.м. 187,61).

rac-(1*R*,2*R*)-2-Амино-1-фенилпропан-1-ола гидрохлорид.

Кристаллический порошок.

Растворим в воде.

Температура плавления. От 180 до 181 °С.

Обесцвечивающий раствор. Смесь растворителей: уксусная кислота ледяная – метанол – вода 1:4:5.

Октан. [111-65-9].C_8H_{18}. (М.м. 114,23).

Октан.

Бесцветная прозрачная жидкость с характерным запахом.

d_4^{20}. Около 0,703.

n_D^{20}. Около 1,397.

Температура кипения. 125,7 °С.

Октанол. [111-87-5]. $C_8H_{18}O$. (М.м. 130,23).

Октан-1-ол.

Бесцветная жидкость.

Практически нерастворим в воде, смешивается со спиртом 96 % и эфиром.

d_{20}^{20}. Около 0,828.

Температура кипения. Около 195 °С.

3-Октанон. [106-68-3]. $C_8H_{16}O$. (М.м. 128,21). Октан-3-он.

Бесцветная жидкость с характерным запахом.

Практически нерастворим в воде, смешивается с этанолом и эфиром.

d_{20}^{20}. Около 0,822.

n_D^{20}. Около 1,415.

Температура кипения. Около 167 °С.

Хроматографическая чистота 3-октанона, применяемого в газовой хроматографии, должна быть не менее 98,0 %.

Олеамид. [301-02-0]. $C_{18}H_{35}NO$. (М.м. 281,48).

(9*Z*)-Октадец-9-енамид.

Порошок или гранулы от белого до желтоватого цвета.

Практически нерастворим в воде, очень легко растворим в метиленхлориде, растворим в этаноле.

Температура плавления. Около 80 °С.

Олова(II) хлорид. [10025-69-1]. $SnCl_2 \cdot 2H_2O$. (М.м. 225,65).

Хлорид олова(II), дигидрат.

Содержит не менее 97,0 % $SnCl_2 \cdot 2H_2O$.

Бесцветные кристаллы.

Очень легко растворим в воде, легко растворим в спирте 96 %, уксусной кислоте ледяной, хлористоводородной кислоте разведённой и концентрированной.

Олова(II) хлорида раствор (1).

20 г олова металлического нагревают с 85 мл хлористоводородной кислоты концентрированной до прекращения выделения водорода, охлаждают.

Хранят раствор над избытком олова, защищая от воздуха.

Олова(II) хлорида раствор (2).

Непосредственно перед использованием раствор олова(II) хлорида (1) разводят хлористоводородной кислотой разведённой 7,3 % 1:10.

Олова(II) хлорида раствор 8 %.

К 8 г олова(II) хлорида прибавляют 100 мл раствора 20 % (о/о) хлористоводородной кислоты, встряхивают до растворения, если необходимо, нагревают при температуре 50 °С и пропускают азот в течение 15 мин.

Готовят непосредственно перед использованием.

Олова(II) хлорида раствор 10 %. Олова закисного хлорида раствор.

1 г олова(II) хлорида растворяют в 5 мл воды, в случае появления опалесценции прибавляют 1 мл хлористоводородной кислоты концентрированной и доводят объём раствора водой до 10,0 мл.

Олово. [7440-31-5]. Sn. (А.м. 118,71). Олово.

Гранулы серебристо-белого цвета.

Растворимо в хлористоводородной кислоте концентрированной с выделением водорода.

Мышьяк. Не более 0,001 % (10 ppm).

Оранжевый III. См. **Метиловый оранжевый**.

Оранжевый IV. См. **Тропеолин ОО**.

Орацетовый синий 2R. [4395-65-7]. $C_{20}H_{14}N_2O_2$. (М.м. 314,34).

1-Амино-4-анилиноантрацен-9,10-дион.

Температура плавления. Около 194 °С.

Орацетовый синий B. [12769-16-3]. $C_{21}H_{16}N_2O_2$. (М.м. 328,37).

4-Анилино-1-(метиламино)антрацен-9,10-дион.

Порошок сине-фиолетового цвета.

Практически нерастворим в воде, легко растворим в ацетоне и уксусной кислоте безводной.

Орацетового синего B раствор 0,5 %.

1 г орацетового синего B растворяют в 200 мл уксусной кислоты ледяной. При титровании в неводной среде изменяет окраску от голубого цвета (основание) через пурпурный (нейтральная среда) до розового цвета (кислая среда).

Ортофосфорная кислота. См. **Фосфорная кислота**.

Ортофосфорная кислота концентрированная. См. **Фосфорная кислота концентрированная**.

Орцин. [6153-39-5]. $C_7H_8O_2 \cdot H_2O$. (М.м. 142,15). 5-Метилбензол-1,3-диол, моногидрат.

Бесцветный кристаллический порошок, чувствителен к свету.

Растворим в воде, легко растворим в этаноле и эфире.

Температура кипения. Около 290 °С.

Температура плавления. От 58 до 61 °С.

Осмия(VIII) оксид. [20816-12-0]. OsO_4. (М.м. 254,23).

Оксид осмия(VIII).

Игольчатые кристаллы светло-желтого цвета или кристаллическая масса желтого цвета. Гигроскопичен, чувствителен к свету.

Растворим в воде, спирте 96 % и эфире.

Хранят в воздухонепроницаемой упаковке.

Осмия(VIII) оксида раствор 0,25 %. Раствор 2,5 г/л в 0,05 М растворе серной кислоты.

Палладий. [7440-05-3]. Pd. (А.м. 106,42). Палладий.

Металл серовато-белого цвета.

Растворим в хлористоводородной кислоте 25 %.

Палладия хлорид. [7647-10-1]. $PdCl_2$. (М.м. 177,33). Хлорид палладия(II).

Кристаллы красного цвета.

Растворим в воде, ацетоне; растворим в хлористоводородной кислоте концентрированной.

Палладия хлорида раствор.

1,0 г палладия хлорида растворяют в 10 мл теплой хлористоводородной кислоты концентрированной, полученный раствор доводят смесью равных объёмов хлористоводородной кислоты разведённой 7,3 % и воды до объёма 250,0 мл.

Непосредственно перед использованием раствор разбавляют 2 объёмами воды.

Пальмитиновая кислота. [57-10-3]. $C_{16}H_{32}O_2$. (М.м. 256,42). Гексадекановая кислота.

Кристаллические чешуйки белого цвета.

Практически нерастворима в воде, легко растворима в горячем спирте 96 % и эфире.

Температура плавления. Около 63 °С.

Парарозанилина гидрохлорид. [569-61-9]. $C_{19}H_{17}N_3 \cdot HCl$. (М.м. 323,82).

4-[Бис(4-аминофенил)метилен]циклогекса-2,5-диен-1-иминия хлорид.

Кристаллический порошок синевато-красного цвета.

Мало растворим в воде, растворим в этаноле, практически нерастворим в эфире.

Растворы в воде и этаноле имеют интенсивную красную окраску, растворы в разведённых серной и хлористоводородной кислотах имеют желтую окраску.

Температура плавления. Около 270 °С с разложением.

Парарозанилина обесцвеченный раствор.

0,1 г парарозанилина гидрохлорида помещают в колбу с притертой стеклянной пробкой, прибавляют 60 мл воды и раствора 1,0 г натрия сульфита безводного или раствора 2,0 г натрия сульфита, или раствора 0,75 г натрия метабисульфита в 10 мл воды, затем медленно при перемешивании прибавляют 6 мл кислоты хлористоводородной разведённой 7,3 %, закрывают колбу пробкой и продолжают перемешивание до растворения; объём полученного раствора доводят водой до 100,0 мл.

Раствор используют через 12 ч после приготовления.

Хранят в защищенном от света месте.

Парацетамол. [103-90-2]. $C_8H_9NO_2$. (М.м. 151,16).

N-(4-Гидроксифенил)ацетамид.

Белый или почти белый кристаллический порошок, легко растворим в спирте 96 %, растворим в ацетоне, умеренно растворим в воде.

Температура плавления. От 168 до 172 °С.

Парацетамол, свободный от 4-аминофенола

Парацетамол перекристаллизовывают из воды и сушат в вакууме при температуре 70 °С; процедуру повторяют до тех пор, пока парацетамол не будет выдерживать следующее испытание.

5 г высушенного парацетамола растворяют в смеси равных объёмов метанола и воды и доводят объём раствора той же смесью растворителей до 100,0 мл.

Прибавляют 1 мл свежеприготовленного раствора, содержащего 10 г/л натрия нитропруссида и 10 г/л натрия карбоната безводного, перемешивают и выдерживают в течение 30 мин в защищенном от света месте. Не должно появляться синее или зеленое окрашивание.

Пентан. [109-66-0]. C_5H_{12}. (М.м. 72,15). Пентан.

Прозрачная, бесцветная, воспламеняющаяся жидкость.

Очень мало растворим в воде, смешивается с ацетоном, этанолом и эфиром.

d_{20}^{20}. Около 0,63.

n_D^{20}. Около 1,359.

Температура кипения. Около 36 °C.

Пентан, используемый в спектрофотометрии, должен выдерживать следующее дополнительное испытание.

Минимальное пропускание. 20 % при длине волны 200 нм; 50 % при длине волны 210 нм; 85 % при длине волны 220 нм; 93 % при длине волны 230 нм; 98 % при длине волны 240 нм.

Определение проводят, используя в качестве раствора сравнения воду.

Пентанол. [71-41-0]. $C_5H_{12}O$. (М.м. 88,15). Пентан-1-ол.

Бесцветная жидкость.

Умеренно растворим в воде, смешивается со спиртом 96 % и эфиром.

n_D^{20}. Около 1,410.

Температура кипения. Около 137 °C.

Пентафторпропановая кислота. [422-64-0]. $C_3HF_5O_2$. (М.м. 164,03).

Пентафторпропановая кислота.

Прозрачная бесцветная жидкость.

d_4^{20}. Около 1,561.

n_D^{20}. Около 1,284.

Температура кипения. Около 97 °C.

Пентафторпропионовый ангидрид. [356-42-3]. $C_6F_{10}O_3$. (М.м. 310,05).

Пентафторпропановый ангидрид.

d_4^{25}. Около 1,571.

n_D^{20}. Около 1,29.

Температура кипения. 70,5 °С.

***трет*-Пентиловый спирт**. [75-85-4]. $C_5H_{12}O$. (М.м. 88,15).

2-Метилбутан-2-ол.

Летучая воспламеняющаяся жидкость.

Легко растворим в воде, смешивается со спиртом 96 %, эфиром и глицерином.

d_{20}^{20}. Около 0,81.

Температурные пределы перегонки. От 100 до 104 °С; должно перегоняться не менее 95 %.

Хранят в защищенном от света месте.

Перметрин. [52645-53-1]. $C_{21}H_{20}Cl_2O_3$. (М.м. 391,29).

[(3-Феноксифенил)метил][2,2-диметил-3-(2,2-дихлорэтен-1-ил)циклопропанкарбоксилат].

Температура плавления. От 34 до 35 °С.

Пергидроль. **Водорода пероксида раствор концентрированный**. См. **Водорода пероксид**.

Песок.

Крупинки кремния диоксида белого или слегка сероватого цвета с размером частиц от 150 до 300 мкм.

Петролейный эфир. [8032-32-4].

Прозрачная, бесцветная, воспламеняющаяся жидкость, не флуоресцирует. Практически нерастворим в воде, смешивается со спиртом 96 %.

d_{20}^{20}. От 0,661 до 0,664.

Температурные пределы перегонки. От 50 до 70 °С.

Петролейный эфир (1).

Должен выдерживать требования для петролейного эфира (1) со следующими изменениями:

d_{20}^{20}. От 0,630 до 0,656.

Температурные пределы перегонки. От 40 до 60 °С.

Не должен мутнеть при температуре 0 °С.

Петролейный эфир (2).

Должен выдерживать требования для петролейного эфира со следующими изменениями:

d_{20}^{20}. От 0,620 до 0,630.

Температурные пределы перегонки. От 30 до 40 °С.

Не должен мутнеть при температуре 0 °С.

Петролейный эфир (3).

Должен выдерживать требования для петролейного эфира со следующими изменениями:

d_{20}^{20}. Около 0,720.

Температурные пределы перегонки. От 100 до 120 °С.

Вода: не более 0,03 %.

Петролейный эфир (4).

Должен выдерживать требования для петролейного эфира со следующими изменениями:

d_{20}^{20}. Около 0,70.

Температурные пределы перегонки. От 80 до 100 °С.

Пикриновая кислота. [88-89-1]. $C_6H_3N_3O_7$. (М.м. 229,10).

2,4,6-Тринитрофенол.

Призмы или пластинки желтого цвета. Ядовита.

Растворима в воде и спирте 96 %.

Хранят, увлажняя водой.

Пикриновой кислоты раствор 1 %. Раствор 10 г/л.

Хранят в стеклянных сосудах с притертыми пробками в защищенном от света месте.

Срок годности – 2 мес.

Пикриновой кислоты насыщенный раствор.

12,3 г пикриновой кислоты заливают 1 л воды и оставляют при частом взбалтывании на 24 ч.

Хранят в стеклянных сосудах с притертыми пробками в защищенном от света месте.

Пикриновой кислоты раствор.

К 100 мл насыщенного раствора пикриновой кислоты прибавляют 0,25 мл 20 % раствора натрия гидроксида.

Пикриновой кислоты насыщенный раствор в абсолютированном спирте.

6,25 г пикриновой кислоты заливают 100 мл абсолютированного спирта и оставляют при частом взбалтывании на 24 ч.

Хранят в стеклянных сосудах с притертыми пробками в защищенном от света месте, вдали от огня.

β-Пинен. [127-91-3]. $C_{10}H_{16}$. (М.м. 136,23).

rac-(1*R*,5*R*)-6,6-Диметил-2-метиленбицикло[3.1.1]гептан.

Бесцветная, маслянистая жидкость с запахом скипидара.

Практически нерастворим в воде, смешивается со спиртом 96 % и эфиром.

d_{20}^{20}. Около 0,867.

n_D^{20}. Около 1,474.

Температура кипения. От 155 до 156 °С.

Хроматографическая чистота β-пинена, используемого в газовой хроматографии, должна быть не менее 99,0 %.

Пиперидин. [110-89-4]. $C_5H_{11}N$. (М.м. 85,15). Пиперидин.

Бесцветная или слегка желтоватого цвета жидкость, имеет щелочную реакцию.

Смешивается с водой, спиртом 96 %, эфиром и петролейным эфиром.

Температура кипения. Около 106 °С.

Пиперидина гидрохлорид. [6091-44-7]. $C_5H_{11}N \cdot HCl$. (М.м. 121,61).

Пиперидина гидрохлорид.

Белый кристаллический порошок, гигроскопичен.

Содержит не менее 99 % $C_5H_{11}N \cdot HCl$.

Растворим в воде.

Температура плавления. От 245 до 249 °С.

Пирид-2-иламин. [504-29-0]. $C_5H_6N_2$. (М.м. 94,12). Пиридин-2-амин.

Крупные кристаллы.

Растворим в воде, спирте 96 % и эфире.

Температура кипения. Около 210 °С.

Температура плавления. Около 58 °С.

Пиридилазонафтол. [85-85-8]. $C_{15}H_{11}N_3O$. (М.м. 249,27).

1-(Пиридин-2-илдиазенил)нафталин-2-ол.

Порошок кирпично-красного цвета.

Практически нерастворим в воде, растворим в спирте, метаноле и горячих разведённых растворах гидроксидов щелочных металлов.

Температура плавления. Около 138 °С.

Пиридилазонафтола раствор 0,1 %. Раствор 1 г/л в этаноле.

Испытание на чувствительность. К 50 мл воды прибавляют 10 мл ацетатного буферного раствора pH 4,4, 0,10 мл 0,02 М раствора натрия эдетата и 0,25 мл раствора пиридилазонафтола; после прибавления 0,15 мл 0,5 % раствора меди(II) сульфата окраска должна измениться от светло-желтой к фиолетовой.

Пиридин. [110-86-1]. C_5H_5N. (М.м. 79,10). Пиридин.

Прозрачная, бесцветная, гигроскопичная жидкость. Обладает характерным неприятным запахом. Ядовит.

Смешивается с водой и спиртом 96 %.

Температура кипения. Около 115 °С.

Хранят в воздухонепроницаемой упаковке.

Пиридин безводный.

Пиридин сушат над натрия карбонатом безводным, фильтруют и перегоняют.

Вода. Не более 0,01 % (м/м).

Пиримифос-этил. [23505-41-1]. $C_{13}H_{24}N_3O_3PS$. (М.м. 333,39).

O-[2-(Диэтиламино)-6-метилпиримидин-4-ил]-*O*,*O*-диэтилтиофосфат.

Температура плавления. От 15 до 18 °С.

Пировиноградная кислота. [127-17-3]. $C_3H_4O_3$. (М.м. 88,06).

2-Оксопропановая кислота.

Жидкость желтоватого цвета. Смешивается с водой, этанолом и эфиром.

d_{20}^{20}. Около 1,267.

n_D^{20}. Около 1,413.

Температура кипения. Около 165 °С.

Пирогаллол. [87-66-1]. $C_6H_6O_3$. (М.м. 126,11). Бензол-1,2,3-триол.

Кристаллы белого цвета, под действием воздуха и света темнеют.

Очень легко растворим в воде, спирте 96 % и эфире, мало растворим в углерода дисульфиде.

Под действием воздуха водные растворы, а еще быстрее щелочные растворы, приобретают коричневую окраску вследствие абсорбции кислорода.

Температура плавления. Около 131 °С.

Хранят в защищенном от света месте.

Пирогаллола раствор.

0,5 г пирогаллола растворяют в 100 мл воды и разливают в поглотительные сосуды по 10 мл. Непосредственно перед использованием в раствор прибавляют 3 капли 30 % раствора калия гидроксида. Раствор используют свежеприготовленным.

Пирогаллола щелочной раствор.

0,5 г пирогаллола растворяют в 2 мл воды, свободной от углерода диоксида. 12 г калия гидроксида растворяют в 8 мл воды, свободной от углерода диоксида.

Непосредственно перед использованием смешивают оба раствора.

Пирокатехин. [120-80-9]. $C_6H_6O_2$. (М.м. 110,11). Бензол-1,2-диол.

Бесцветные или слабо-желтого цвета кристаллы.

Растворим в воде, ацетоне, спирте 96 % и эфире.

Температура плавления. Около 102 °С.

Хранят в защищенном от света месте.

Пирокатехиновый фиолетовый. [115-41-3]. $C_{19}H_{14}O_7S$. (М.м. 386,39).

3,3-Бис(3,4-дигидроксифенил)-3*H*-2,1λ^6-бензоксатиол-1,1-дион.

Порошок красно-коричневого или зелено-коричневого цвета.

Легко растворим в воде и спирте 96 %, растворим в уксусной кислоте ледяной, практически нерастворим в эфире, ацетоне, бензоле.

В интервале pH 2,0 – 3,0 индикатор имеет желтую окраску, его комплексы с ионом висмута в тех же условиях синего цвета.

Переход окраски при прямом титровании иона висмута от синей к желтой.

В щелочной среде индикатор имеет красно-фиолетовую окраску, его комплексы с ионами магния и цинка в тех же условиях зеленовато-синего цвета.

Переход окраски при прямом титровании ионов магния и цинка от зеленовато-синей к красно-фиолетовой.

Пирокатехинового фиолетового раствор. 0,1 % раствор.

Пирокатехинового фиолетового индикаторная смесь.

0,25 г пирокатехинового фиолетового и 25 г натрия хлорида растирают в ступке и перемешивают.

Пирролидин. [123-75-1]. C_4H_9N. (М.м. 71,12).

Пирролидин.

Содержание. Не менее 99 %.

Температура кипения. От 87 до 88 °С.

2-Пирролидон. [616-45-5]. C_4H_7NO. (М.м. 85,10).

Пирролидин-2-он.

Бесцветная жидкость при температуре выше 25 °С.

Смешивается с водой, с безводным спиртом и этилацетатом.

d_4^{25}. Около 1,116.

Температура кипения. 245 °С.

Температура плавления. От 23 до 25 °С.

Плюмбон. [1772-02-7]. $C_{18}H_{12}AsN_6Na_3O_8S$. (М.м. 616,3).

4-({4-[3-(2-Арсоно-4-нитрофенил)триаз-1-ен-1-ил]фенил}диазенил)бензолсульфонат тринатрия.

Кирпично-красный порошок.

Растворим в воде, легко растворим в растворе тетрабората натрия, мало растворим в спирте 96 %, практически нерастворим в ацетоне, хлороформе, бензоле.

В боратном буферном растворе (pH около 9,2) индикатор имеет желтую окраску; его комплексы с ионом свинца в тех же условиях розового цвета.

Плюмбона раствор. 0,05 % раствор плюмбона в 2 % растворе динатрия тетрабората. ($Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$).

Повидон. [9003-39-8]. $(C_6H_9NO)_n$.

Поли[1-(2-оксопирролидин-1-ил)этилен].

Белый или желтовато-белый порошок или хлопья; гигроскопичен.

Легко растворим в воде, спирте 96 % и метаноле, умеренно растворим в ацетоне, практически нерастворим в эфире.

Поливиниловый спирт. [9002-89-5]. (М.м. от 20000 до 150000).

Поли(1-гидроксиэтилен).

Желтовато-белый порошок или полупрозрачные гранулы.

Растворим в воде, умеренно растворим в спирте 96 %, практически нерастворим в ацетоне.

Вязкость. От 3 до 70 мПа·с.

Эфирное число. Не более 280.

Поли(диметил)(дифенил)силоксан.

Содержит 95 % метильных групп и 5 % фенильных групп.

Неподвижная фаза для газовой хроматографии.

Поли(диметил)(дифенил)(дивинил)силоксан.

Содержит 94 % метильных групп, 5 % фенильных групп и 1 % винильных групп.

Неподвижная фаза для газовой хроматографии.

Поли(диметил)силоксан. [63148-62-9].

Поли[окси(диметилсилан)].

Кремнийорганический полимер (содержащий метильные группы), имеющий вид полужидкой бесцветного масла.

Характеристическая вязкость. Около 115 мл·г$^{-1}$.

Инфракрасный спектр поглощения, полученный нанесением вещества, при необходимости диспергированного в нескольких каплях углерода тетрахлорида, на диск натрия хлорида, не должен иметь поглощения при частоте 3053 см$^{-1}$, соответствующего винильным группам.

Потеря в массе при высушивании. Не более 2,0 %. Определение проводят из 1,000 г, сушат в вакууме при температуре 350 °С в течение 15 мин.

Не более 0,8 %. Определение проводят из 2,000 г, сушат при температуре 200 °С в течение 2 ч.

Полиметилфенилсилоксан. [63148-58-3].

Поли[окси(метилфенилсиландиил)].

Кремнийорганический полимер (содержащий метильные и фенильные группы), имеющий вид полужидкой бесцветного масла. Средняя молекулярная масса 4000.

Очень вязкая жидкость (вязкость около 1300 мПа · с).

Неподвижная фаза для газовой хроматографии.

d_{25}^{25}. Около 1,09.

n_D^{25}. Около 1,540.

Поли[метил(95)фенил(5)]силоксан. См. **Поли(диметил)(дифенил)силоксан**.

Поли[метил(94)фенил(5)винил(1)]силоксан. См. **Поли(диметил)(дифенил)(дивинил)силоксан**.

Полиоксиэтилированное касторовое масло.

Жидкость светло-желтого цвета, становится прозрачной при температуре около 26 °С.

Полисорбат 20. [9005-64-5].

Сополимер смеси эфиров лауриловой кислоты, сорбита и его ангидридов с этиленоксидом с примерным соотношением 20 моль этиленоксида на каждый моль сорбита и ангидридов сорбита.

Маслянистая, желтоватая или коричневато-желтая прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость.

Смешивается с водой, этанолом, этилацетатом и метанолом, практически нерастворима в жирных маслах.

Плотность. Около 1,10.

Полисорбат 80. [9005-65-6].

Сополимер смеси эфиров различных жирных кислот, в основном олеиновой кислоты, сорбита и его ангидридов с этиленоксидом с примерным соотношением 20 моль этиленоксида на каждый моль сорбита и ангидридов сорбита.

Маслянистая желтоватая или коричневато-желтая прозрачная жидкость. Смешивается с водой, этанолом, этилацетатом и метанолом, практически нерастворим в жирных маслах.

Плотность. Около 1,08.

Вязкость. Около 400 мПа·с при температуре 25 °C.

Полистирол 900-1000. [9003-53-6].

Поли(1-фенилэтилен).

Стандарт, используемый для калибровки в газовой хроматографии.

M_w. Около 950.

M_w/M_n. 1,10.

Поли(цианопропил)силоксан.

Полисилоксан, замещенный на 100 % цианопропильными группами.

Поли[(цианопропил)(фенил)][диметил]силоксан.

Содержит 6 % цианопропилфенильных групп и 94 % диметильных групп.

Неподвижная фаза для газовой хроматографии.

Поли(цианопропил)(7)(фенил)(7)(метил)(86)силоксан.

Полисилоксан, замещенный на 7 % цианопропильными группами, на 7 % фенильными группами и на 86 % диметильными группами.

Неподвижная фаза для газовой хроматографии.

Поли(цианопропил)(фенилметил)силоксан.

Содержит 90 % цианопропильных групп и 10 % фенилметильных групп.

Неподвижная фаза для газовой хроматографии.

Поли[(цианопропил)метилфенилметилсилоксан]. См. **Поли[(цианопропил)(метил)][(фенил)(метил)]силоксан**.

Поли[(цианопропил)(метил)][(фенил)(метил)]силоксан.

Содержит 25 % цианопропильных групп, 25 % фенильных групп и 50 % метильных групп. (Средняя молекулярная масса – 8000).

Очень вязкая жидкость (вязкость около 9000 мПа · с).

d_{25}^{25}. Около 1,10.

n_D^{25}. Около 1,502.

Полиэтиленгликоль 200, 300, 400, 1000, 1500 или 20000. См. соответствующий **Макрогол**.

Полиэтиленгликольадипинат. [24938-37-2]. $(C_8H_{12}O_4)_n$.

Поли(оксиэтан-1,2-диилоксигексан-1,6-диоил).

Воскообразная масса белого цвета.

Практически нерастворим в воде, растворим в хлороформе.

Температура плавления. Около 43 °С.

Полиэтиленгликольсукцинат. [25569-53-3]. $(C_6H_8O_4)_n$.

Поли(оксиэтан-1,2-диилоксибутан-1,4-диоил).

Кристаллический порошок белого цвета.

Практически нерастворим в воде, растворим в хлороформе.

Температура плавления. Около 102 °С.

Полиэфирный гидроксилированный гель для хроматографии.

Гель с небольшим размером частиц, имеющий гидрофильную поверхность к гидроксильным группам. Имеет предел эксклюзии по декстрану с молекулярной массой от $2 \cdot 10^5$ до $2{,}5 \cdot 10^6$.

Пропанол. [71-23-8]. C_3H_8O. (М.м. 60,10). Пропан-1-ол.

Прозрачная, бесцветная жидкость.

Смешивается с водой и спиртом 96 %.

d_{20}^{20}. Около от 0,802 до 0,806.

Температура кипения. Около 97,2 °С.

Температурные пределы перегонки. От 96 до 99 °С; должно перегоняться не менее 95 %.

2-Пропанол. [67-63-0]. C_3H_8O. (М.м. 60,10). Пропан-2-ол.

Прозрачная, бесцветная, воспламеняющаяся жидкость.

Смешивается с водой и спиртом 96 %.

d_{20}^{20}. Около 0,785.

Температура кипения. От 81 до 83 °С.

2-Пропанол особой чистоты. Должен выдерживать требования для изопропанола и следующие дополнительные требования:

n_D^{20}. Около 1,378.

Вода. Не более 0,05 %. Определение проводят из 10 г.

Минимальное пропускание. 25 % при длине волны 210 нм; 55 % при длине волны 220 нм; 75 % при длине волны 230 нм; 95 % при длине волны 250 нм; 98 % при длине волны 260 нм.

Определение проводят, используя в качестве раствора сравнения воду.

Пропаноламин. [156-87-6]. C_3H_9NO. (М.м. 75,11). 3-Аминопропан-1-ол.

Прозрачная, бесцветная, вязкая жидкость.

d_{20}^{20}. Около 0,99.

n_D^{20}. Около 1,461.

Температура плавления. Около 11 °С.

Пропилацетат. [109-60-4]. $C_5H_{10}O_2$. (М.м. 102,14).

Пропилацетат.

Прозрачная бесцветная жидкость.

d_{20}^{20}. Около 0,888.

Температура кипения. Около 102 °С.

Температура плавления. Около – 95 °С.

Пропиленгликоль. [57-55-6]. $C_3H_8O_2$. (М.м. 76,09). (2*RS*)-Пропан-1,2-диол.

Прозрачная бесцветная вязкая жидкость.

Смешивается с водой и спиртом 96 %.

Температура кипения. От 184 до 189 °С.

d_{20}^{20}. От 1,035 до 1,040.

n_D^{20}. От 1,431 до 1,433.

Пропиленгликолькарбонат. [108-32-7]. $C_4H_6O_3$. (М.м. 103,09).

(4*RS*)-4-Метил-1,3-диоксолан-2-он.

Бесцветная жидкость без запаха.

Температура плавления: –49°С

Температура кипения: 242°С.

d^{25}. Около 1,204.

n_D^{20}. Около 1,421.

Пропиленоксид. [75-56-9]. C_3H_6O. (М.м. 58,08).

(2*RS*)-2-Метилоксиран.

Бесцветная жидкость.

Температура кипения. 34,3 °С

Смешивается со спиртом 96 %, эфиром.

Пропилпарагидроксибензоат. [94-13-3]. $C_{10}H_{12}O_3$. (М.м. 180,20).

Пропил(4-гидроксибензоат).

Белый кристаллический порошок.

Очень мало растворим в воде, легко растворим в спирте 96 % и метаноле.

Температура плавления. От 96 до 99 °С.

Пропионовая кислота. [79-09-4]. $C_3H_6O_2$. (М.м. 74,08). Пропановая кислота.

Маслянистая жидкость.

Растворима в спирте 96 % и эфире, смешивается с водой.

d_{20}^{20}. Около 0,993.

n_D^{20}. Около 1,387.

Температура кипения. Около 141 °С.

Температура плавления. Около 21 °С.

Пропионовый альдегид. [123-38-6]. C_3H_6O. (М.м. 58,08). Пропаналь.

Жидкость. Легко растворим в воде, смешивается со спиртом 96 % и эфиром.

d_{20}^{20}. Около 0,81.

n_D^{20}. Около 1,365.

Температура кипения. Около 49 °С.

Температура плавления. Около – 81 °С.

Пропионовый ангидрид. [123-62-6]. $C_6H_{10}O_3$. (М.м. 130,14).

Пропановый ангидрид.

Прозрачная, бесцветная жидкость.

Разлагается в воде и спирте 96 %, смешивается с эфиром.

d_{20}^{20}. Около 1,01.

Температура кипения. Около 167 °С.

Пропионового ангидрида реактив.

1 г толуолсульфоновой кислоты растворяют в 30 мл уксусной кислоты ледяной и прибавляют 5 мл пропионового ангидрида.

Используют через 15 мин после приготовления.

Срок годности 1 сут.

Протравной черный 11. См. **Эриохром черный Т**.

Прочный синий В, соль. [14263-94-6]. $C_{14}H_{12}Cl_2N_4O_2 \cdot ZnCl_2$. (М.м. 475,5).

3,3′-Диметокси[1,1'-бифенил]-4,4′-бис(диазония) дихлорид—хлорид цинка (1/1).

Порошок темно-зеленого цвета.

Растворим в воде.

Хранят в воздухонепроницаемой упаковке при температуре от 2 до 8 °С.

Прочный красный В, соль. [49735-71-9]. $C_{17}H_{13}N_3O_9S_2$. (М.м. 467,4).

2-Метокси-4-нитробензолдиазония нафталин-1,5-дисульфонат (1:1).

Порошок оранжево-желтого цвета.

Растворим в воде, мало растворим в спирте 96 %.

Хранят в воздухонепроницаемой упаковке, в защищенном от света месте при температуре от 2 до 8 °С.

Пулегон. [89-82-7]. $C_{10}H_{16}O$. (М.м. 152,23).

(5*R*)-5-Метил-2-(пропан-2-илиден)циклогексан-1-он.

Бесцветная, маслянистая жидкость.

Практически нерастворим в воде, смешивается со спиртом 96 % и эфиром.

d_{15}^{20}. Около 0,936.

n_D^{20}. От 1,485 до 1,489.

$[\alpha]_D^{20}$. От + 19,5 до + 22,5°.

Температура кипения. От 222 до 224 °С.

Хроматографическая чистота пулегонанетола, применяемого в газовой хроматографии, должна быть не менее 98,0 %.

Рамноза. [6155-35-7]. $C_6H_{12}O_5 \cdot H_2O$. (М.м. 182,17).

6-Дезокси-L-маннопираноза моногидрат.

Кристаллический порошок белого цвета.

Легко растворима в воде.

$[\alpha]_D^{20}$. От + 7,8 до + 8,3° (5 % раствор в воде, содержащей около 0,05 % NH_3).

Рапонтицин. [155-58-8]. $C_{21}H_{24}O_9$. (М.м. 420,4).

[3-Гидрокси-5-[2-(3-гидрокси-4-метоксифенил)этен-1-ил]фенил]-β-D-глюкопиранозид.

Кристаллический порошок желтовато-серого цвета.

Растворим в спирте 96 % и метаноле.

Раствор крахмала-индикатор. См. **Крахмал растворимый**.

Раствор формальдегида. См. **Формалин технический.**

Растворимый красный 1. См. **Судан красный G**.

Реактив ван-Урка.

К 35 мл воды приливают при помешивании 65 мл серной кислоты концентрированной и в еще горячий раствор вносят 0,03 мл 10 % раствора железа(III) хлорида. После охлаждения раствора до температуры 50 °С прибавляют 0,2 г диметиламинобензальдегида.

Реактив используют не ранее, чем через 24 ч после приготовления.

Срок годности 7 сут.

Реактив Драгендорфа.

Раствор I. К 0,85 г висмута нитрата основного прибавляют 40 мл воды, 10 мл уксусной кислоты и взбалтывают в течение 15 мин.

Раствор II. 8 г калия йодида растворяют в 20 мл воды.

Смешивают равные объёмы растворов I и II. К 10 мл полученной смеси прибавляют 100 мл воды и 20 мл уксусной кислоты концентрированной.

Реактив Драгендорфа модифицированный.

Раствор I. К 0,85 г висмута нитрата основного прибавляют 40 мл воды, 10 мл уксусной кислоты концентрированной и взбалтывают в течение 15 мин.

Раствор II. 8 г калия йодида растворяют в 20 мл воды.

Растворы I и II смешивают (основной раствор).

Непосредственно перед применением 5 мл основного раствора смешивают с 5 мл 1 % водного раствора аскорбиновой кислоты и 5 мл спирта 96 %.

Реактив Майера.

1,358 г ртути дихлорида растворяют в 60 мл воды, прибавляют раствор 5 г калия йодида в 10 мл воды и доводят объём раствора водой до 100 мл.

Реактив Марки. См. **Формальдегида раствор в серной кислоте концентрированной**.

Реактив Миллона.

Готовят по одному из методов.

1. 10 г ртути(I) нитрата растворяют в 8,5 мл азотной кислоты концентрированной и разбавляют двойным объёмом воды; прозрачный раствор сливают.

2. 10 г металлической ртути растворяют в 15 мл азотной кислоты концентрированной и прибавляют 30 мл воды; прозрачный раствор сливают.

Реактив Несслера. См. **Калия тетрайодомеркурата(II) щелочной раствор**.

Реактив Оллпорта. См. **Диметиламинобензальдегида раствор**.

Реактив Тиле. См. **Натрия гипофосфита раствор**.

Реактив Фелинга. См. **Медно-тартратный реактив**.

Реактив Фишера.

Раствор I. В сосуд, содержащий 110 г пиридина (содержание воды не более 0,1 %) и охлаждаемый льдом, пропускают обезвоженный сернистый газ до привеса 27 г.

Срок годности раствора 1 – 6 мес.

Раствор II. В сосуд из оранжевого стекла с притертой пробкой помещают 600 мл метанола (содержание воды не более 0,1 %) и 75 г йода, закрывают пробкой, перемешивают и оставляют стоять до полного растворения йода.

Срок годности раствора 2 – 6 мес.

Растворы I и II непосредственно перед использованием смешивают в соотношении 1:2,17. Титр полученного реактива около 0,004 г/мл.

Разбавленный реактив Фишера с титром около 0,001 г/мл готовят, смешивая полученный раствор с метанолом в соотношении 1:1, и применяют только при электрометрическом определении конечной точки титрования.

Установка титра. Около 0,04 г (точная навеска) воды вносят в сухую колбу, содержащую 5 мл метанола, и титруют реактивом Фишера, прибавляя в конце титрования по 0,10 – 0,05 мл.

Параллельно титруют 5 мл метанола.

Титр реактива Фишера (W), в граммах на миллилитр, вычисляют по формуле:

$$W = \frac{a}{V_1 - V_2},$$

где a – навеска воды, г;

V_1 – объём реактива Фишера, израсходованный на титрование навески воды в метаноле, мл;

V_2 – объём реактива Фишера, израсходованный на титрование в контрольном опыте, мл.

Примечание. 1. Реактив Фишера описанного состава неприменим для анализа соединений, реагирующих с одним или несколькими компонентами реактива (например, аскорбиновая кислота, меркаптаны, сульфиды, гидрокарбонаты и карбонаты щелочных металлов, оксиды и гидроксиды металлов, альдегиды, кетоны и др.).
2. Для определения воды в карбонильных соединениях и сильных кислотах при электрометрическом определении конечной точки титрования можно использовать реактив Фишера видоизмененного состава, содержащий вместо метанола *N*,*N*-диметилформамид.
3. Допускается использование коммерческих растворов I и II.

Реактив Фолина. См. **Калия нафтохинонсульфонат**.

Реактив Фолина-Дениса.

В круглодонную колбу помещают 70 мл воды, 10,0 г натрия вольфрамата, 2,0 г фосфорномолибденовой кислоты, 5 мл 85 % фосфорной кислоты и кипятят с обратным холодильником в течение 2 ч. Смесь охлаждают, доводят водой объём раствора до 100 мл и хорошо перемешивают.

Хранят в сосудах оранжевого стекла с притертыми пробками не более 5 суток.

Реактив Фолина-Чокальтеу.

100 г натрия вольфрамата и 25 г натрия молибдата растворяют в 700 мл воды, прибавляют 100 мл хлористоводородной кислоты концентрированной и 50 мл фосфорной кислоты концентрированной. Смесь нагревают в стеклянной колбе с обратным холодильником в течение 10 ч, прибавляют 150 г лития сульфата, 50 мл воды и 5 капель брома. Кипятят до удаления избытка брома (в течение 15 мин), охлаждают, доводят объём раствора водой до 1000,0 мл и фильтруют.

Реактив должен иметь желтую окраску. Реактив не пригоден для использования, если приобретает зеленый оттенок, но может быть регенерирован путем кипячения с несколькими каплями брома. Избыток брома обязательно удаляют кипячением.

Хранят при температуре от 2 до 8 °С.

Реактив Фолина-Чокальтеу разведённый.

Смешивают реактив Фолина-Чокальтеу с водой в соотношении 1:2.

Реактив Фреде. См. **Аммония молибдата раствор в серной кислоте концентрированной**.

Реактив Швейцера.

10 г меди(II) сульфата растворяют в 100 мл воды, прибавляют 10 % раствор натрия гидроксида в достаточном для осаждения гидрата окиси меди количестве, собирают последний на фильтре и промывают водой до исчезновения реакции на сульфаты. Влажный осадок растворяют в минимальном количестве 10 % раствора аммиака, необходимом для полного растворения осадка.

Хранят в стеклянных сосудах с притертыми пробками.

Реактив Шталя. Смешивают 5 мл хлористоводородной кислоты концентрированной, 50 мл спирта 96 % и 1 г диметиламинобензальдегида; после полного растворения доводят объём раствора спиртом 96 % до 100 мл.

Реактив Эллмана. См. **5,5′-Дитиобис-2-нитробензойная кислота**.

Резорцин. [108-46-3]. $C_6H_6O_2$. (М.м. 110,11). Бензол-1,3-диол.

Белый или белый с желтоватым оттенком кристаллический порошок. Под действием света и воздуха краснеет.

Очень легко растворим в воде и спирте 96 %, легко растворим в эфире.

Температура плавления. От 109 до 112 °С.

Температура кипения. Около 281 °С.

Резорцина раствор.

К 50 г резорцина прибавляют 50 мл воды и оставляют при частом взбалтывании на 24 ч. Раствор фильтруют.

Хранят в хорошо укупоренных сосудах оранжевого стекла, в защищенном от света месте.

Резорцина раствор 2 %.

2,0 г резорцина растворяют в воде и доводят объём раствора водой до 100 мл. Используют свежеприготовленным.

Резорцина раствор 1 %.

1,0 г резорцина растворяют в воде и доводят объём раствора водой до 100 мл. Используют свежеприготовленным.

Резорцина раствор в бензоле.

К 1,5 г резорцина прибавляют 1 л бензола и оставляют при частом взбалтывании на 24 ч. Прозрачный раствор сливают.

Хранят в стеклянных сосудах с притертыми пробками, в защищенном от света месте.

Резорцина раствор спиртовой 0,1 %. 0,1 г резорцина растворяют в 70 мл спирта 96 % в мерной колбе вместимостью 100 мл, доводят объём спиртом 96 % до метки и перемешивают. Срок годности раствора не более 10 сут при хранении в прохладном и защищенном от света месте.

Резорцина реактив.

К 80 мл хлористоводородной кислоты концентрированной прибавляют 10 мл раствора резорцина, 0,25 мл 2,5 % раствора меди(II) сульфата и доводят объём раствора водой до 100,0 мл.

Используют через 4 ч после приготовления.

Хранят при температуре от 2 до 8 °С. Срок годности 7 сут.

Резорциновый синий. См. **Лакмоид**.

Рейнекат аммония. См. **Аммония рейнекат**.

Рибоза. [50-69-1]. $C_5H_{10}O_5$. (М.м. 150,13). D-Рибофураноза.

Белый кристаллический порошок.

Растворима в воде, мало растворима в спирте 96 %.

Температура плавления. От 88 до 92 °С.

Рицинолеиновая кислота. [141-22-0]. $C_{18}H_{34}O_3$. (М.м. 298,46).

(9*Z*,12*R*)-12-Гидроксиоктадец-9-еновая кислота.

Содержит смесь жирных кислот, полученных гидролизом масла касторового.

Вязкая жидкость от желтого до желтовато-коричневого цвета.

Практически нерастворима в воде, очень легко растворима в этаноле, растворима в эфире.

d_{20}^{20}. Около 0,942.

n_D^{20}. Около 1,472.

Температура плавления. Около 285 °С с разложением.

Родамин В. [81-88-9]. $C_{28}H_{31}ClN_2O_3$. (М.м. 479,0).

6-(Диэтиламино)-9-(2-карбоксифенил)-*N*,*N*-диэтил-3*H*-ксантен-3-иминий хлорид.

Кристаллы зеленого цвета или порошок красновато-фиолетового цвета. Очень легко растворим в воде и спирте 96 %.

Ртути дихлорид. См. **Ртути(II) хлорид**.

Ртути(I) нитрат. [7782-86-7]. $Hg_2(NO_3)_2 \cdot 2H_2O$. (М.м. 561,2).

Нитрат ртути(I), дигидрат.

Бесцветные кристаллы, выветриваются на воздухе. Ядовит.

Реагирует с водой при растворении. Растворим в азотной кислоте, растворах аммиака и ацетоне.

Ртути(II) ацетат. [1600-27-7]. $C_4H_6HgO_2$. (М.м. 318,68). Ацетат ртути(II).

Кристаллы белого цвета. Ядовит.

Очень легко растворим в воде, растворим в спирте 96 %.

Ртути(II) ацетата раствор 0,1 М.

3,19 г ртути(II) ацетата растворяют в уксусной кислоте безводной, доводят объём раствора той же кислотой до 100 мл. Если необходимо, полученный раствор нейтрализуют 0,1 М раствором хлорной кислоты, используя в качестве индикатора 0,05 мл 0,1 % раствора кристаллического фиолетового.

Ртути(II) ацетата раствор 5 %.

5,0 г ртути(II) ацетата растворяют в теплой уксусной кислоте ледяной. После охлаждения доводят объём раствора уксусной кислотой ледяной до 100,0 мл.

Хранят в емкостях из оранжевого стекла в защищенном от света месте.

Ртути(II) ацетата раствор 3 %.

3,0 г ртути(II) ацетата растворяют в теплой уксусной кислоте ледяной. После охлаждения доводят объём раствора уксусной кислотой ледяной до 100,0 мл.

Хранят в емкостях из оранжевого стекла в защищенном от света месте.

Ртути(II) бромид. [7789-47-1]. $HgBr_2$. (М.м. 360,40).

Бромид ртути(II).

Кристаллы или кристаллический порошок белого или светло-желтого цвета. Мало растворим в воде, растворим в спирте 96 %.

Ртути(II) бромида 5 % раствор в спирте 96 %.

5,0 г ртути(II) бромида растворяют при перемешивании в 70 мл спирта 96 % и доводят объём раствора спиртом 96 % до 100 мл.

Ртутно-бромидная бумага.

В прямоугольную чашку помещают 5 % раствор ртути(II) бромида в спирте 96 %, погружают в раствор кусочки белой фильтровальной бумаги плотностью 80 г/м^2 (время фильтрования 100 мл воды при температуре 20 °С через фильтр с поверхностью 10 см^2 и давлении 6.7 кПа: от 40 с до 60 с), размером 1.5×20 см, сложенные вдвое. Бумагу подвешивают на неметаллическую нить, позволяя стечь избытку жидкости, сушат в защищенном от света месте. Отрезают по 1 см с каждого конца каждой полоски и нарезают остальную часть бумаги на квадратики со стороной 1,5 см или диски диаметром 1,5 см.

Хранят в плотно закрытой емкости, обернутой черной бумагой.

Ртути(II) йодид. [7774-29-0]. HgI_2. (М.м. 454,4).

Иодид ртути(II).

Плотный кристаллический порошок ярко-красного цвета.

Мало растворим в воде, умеренно растворим в ацетоне, спирте 96 % и эфире, растворим в избытке 10 % раствора калия йодида.

Хранят в защищенном от света месте.

Ртути(II) нитрат. [7783-34-8]. $Hg(NO_3)_2 \cdot H_2O$ (М.м. 342,62).

Нитрат ртути(II), моногидрат.

Бесцветные или слегка окрашенные кристаллы. Гигроскопичен.

Растворим в воде в присутствии небольшого количества азотной кислоты.

Хранят в воздухонепроницаемой упаковке, в защищенном от света месте.

Ртути(II) нитрата раствор в азотной кислоте.

3 мл ртути осторожно растворяют в 27 мл азотной кислоты дымящей; полученный раствор разводят равным объёмом воды.

Хранят в защищенном от света месте. Срок годности 2 мес.

Ртути(II) оксид. [21908-53-2]. HgO. (М.м. 216,59). Оксид ртути(II).

Порошок от желтого до оранжево-желтого цвета.

Практически нерастворим в воде и спирте 96 %.

Хранят в защищенном от света месте.

Ртути(II) сульфата раствор.

1 г ртути(II) оксида растворяют в смеси 20 мл воды и 4 мл серной кислоты концентрированной.

Ртути(II) тиоцианат. [592-85-8]. $Hg(SCN)_2$. (М.м. 316,75).

Тиоцианат ртути(II).

Кристаллический порошок белого цвета.

Очень мало растворим в воде, мало растворим в спирте 96 % и эфире, растворим в растворах натрия хлорида.

Ртути(II) тиоцианата раствор.

0,3 г ртути(II) тиоцианата растворяют в этаноле и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл.

Срок годности 7 сут.

Ртути(II) хлорид. [7487-94-7]. $HgCl_2$. (М.м. 271,50).

Хлорид ртути(II).

Тяжелый белый порошок или белые кристаллы. Ядовит.

Растворим в воде, эфире и глицерине, легко растворим в спирте 96 %.

Ртути(II) хлорида раствор 5,4 %. Раствор 54 г/л.

Ртуть. [7439-97-6]. Hg. (А.м. 200,59). Ртуть.

Жидкость серебристо-белого цвета, рассыпающаяся на сферические капли, которые не оставляют металического следа при трении о бумагу.

d_{20}^{20}. Около 13,5.

Температура кипения. Около 357 °С.

Рутений красный. [11103-72-3]. $[(NH_3)_5Ru(NH_3)_4ORu(NH_3)_5]Cl_6 \cdot 4H_2O$.

(М.м. 858,5).

Тетрадекаамминдиоксидотрирутения(6+) гексахлорид тетрагидрат.

Порошок коричневато-красного цвета.

Растворим в воде.

Рутения красного раствор 0,08 %. Раствор 0,8 г/л в растворе свинца(II) ацетата 9,5 %.

Рутин. [153-18-4]. $C_{27}H_{30}O_{16}\cdot 3H_2O$. (М.м. 664,6).

5,7-Дигидрокси-3-{[6-*O*-(6-дезокси-α-L-маннопиранозил)-β-D-глюкопиранозил]окси}-2-(3,4-дигидроксифенил)-4*H*-1-бензопиран-4-он тригидрат.

Кристаллический порошок желтого цвета, темнеет на свету.

Очень мало растворим в воде, растворим примерно в 400 частях кипящей воды. Мало растворим в спирте 96 %. Растворим в растворах гидроксидов щелочных металлов и аммиака.

Температура плавления. Около 210 °С с разложением.

Сабинен. [3387-41-5]. $C_{10}H_{16}$. (М.м. 136,23).

4-Метилиден-1-(пропан-2-ил)бицикло[3.1.0]гексан.

Бесцветная маслянистая жидкость.

d_{25}^{25}. Около 0,843.

n_D^{20}. Около 1,468.

Температура кипения. От 163 до 165 °С.

Хроматографическая чистота сабинена, применяемого в газовой хроматографии, должна быть не менее 99,0 %.

Салициловая кислота. [69-72-7]. $C_7H_6O_3$. 2-Гидроксибензойная кислота. (М.м. 138,12).

Белые, мелкие игольчатые кристаллы или легкий кристаллический порошок. Мало растворима в воде, легко растворима в спирте 96 % и эфире, умеренно растворима в метиленхлориде.

Салициловый альдегид. [90-02-8]. $C_7H_6O_2$. (М.м. 122,12).

2-Гидроксибензальдегид.

d_{20}^{20}. Около 1,167.

n_D^{20}. Около 1,574.

Температура кипения. Около 196 °С.

Температура плавления. Около – 7 °С.

Салицилового альдегида азин. [959-36-4]. $C_{14}H_{12}N_2O_2$. (М.м. 240,26).

2,2'-[Гидразин-1,2-диилиденбис(метанилилиден)]дифенол.

0,30 г гидразина сульфата растворяют в 5 мл воды, прибавляют 1 мл уксусной кислоты ледяной и 2 мл свежеприготовленного 20 % (о/о) раствора салицилового альдегида в 2-пропаноле. Перемешивают, выдерживают до образования желтого осадка, затем встряхивают с двумя порциями по 15 мл метиленхлорида.

Объединенные органические извлечения, высушенные над натрия сульфатом безводным, декантируют или фильтруют и выпаривают досуха. Осадок перекристаллизовывают при охлаждении из смеси растворителей метанол – толуол 40:60. Кристаллы сушат в вакууме.

Температура плавления. Около 213 °С.

Сантонин. [481-06-1]. $C_{15}H_{18}O_3$. (М.м. 246,30).

(3*S*,3a*S*,5a*S*,9b*S*)-3,5a,9-Триметил-3a,5,5a,9b-тетрагидронафто[1,2-*b*]фуран-2,8(3*H*,4*H*)-дион.

Бесцветные блестящие кристаллы, желтеющие под действием света.

Очень мало растворим в воде, легко растворим в горячем спирте 96 %, умеренно растворим в этаноле.

Температура плавления. От 174 до 176 °С.

$[\alpha]_D^{18}$. – 173 °С (этанол).

Сапарал. Смесь аммонийных солей тритерпеновых гликозидов-аралозидов А, В и С.

Аморфный порошок кремового или серовато-кремового цвета. Гигроскопичен.

Легко растворим в воде, мало и медленно растворим в спирте 96 %; практически нерастворим в хлороформе.

Сапарала раствор 0,6 %. 0,06 г сапарала растворяют в 10 мл метанола.

Сафранин. [477-73-6]. $C_{20}H_{19}ClN_4$. (М.м. 350,84).

3,7-Диамино-2,8-диметил-5-фенилфеназин-5-ий хлорид.

Темно-красный порошок.

Умеренно растворим в спирте 70 %, образуя прозрачный раствор красного цвета с желтовато-красной флуоресценцией.

Сафранина раствор. 0,1 г сафранина растворяют в 10 мл спирта 50 %.

Сахароза. [57-50-1]. $C_{12}H_{22}O_{11}$. (М.м. 342,30). β-D-Фруктофуранозил-α-D-глюкопиранозид.

Белый кристаллический порошок или блестящие, сухие, бесцветные или белые кристаллы.

Очень легко растворима в воде, умеренно растворима в спирте 96 %, практически нерастворима в этаноле безводном.

Если сахарозу используют для поверки поляриметра, ее хранят в сухом виде в запаянной ампуле.

Свинца(II) ацетат. [6080-56-4]. $C_4H_6O_4Pb \cdot 3H_2O$. (М.м. 379,33).

Ацетат свинца(II), тригидрат.

Бесцветные кристаллы, выветривающиеся на воздухе.

Легко растворим в воде, растворим в спирте 96 %.

Свинца(II) ацетата раствор 10 %.

10 г свинца(II) ацетата растворяют в воде, прибавляют уксусную кислоту 98 % до получения прозрачного раствора и разводят водой до 100,0 мл.

Свинца(II) ацетата раствор 9,5 %. Раствор 95 г/л в воде, свободной от углерода диоксида.

Свинца(II) ацетата основного раствор. Свинцовый уксус.

Содержит не менее 16,7 % (м/м) и не более 17,4 % (м/м). Pb (А.м. 207,19) в виде соединения, соответствующего примерно формуле $C_8H_{14}O_{10}Pb_3$.

40,0 г свинца(II) ацетата растворяют в 90 мл воды, свободной от углерода диоксида. Доводят pH раствора до 7,5 раствором натрия гидроксида концентрированным, центрифугируют и используют прозрачный, бесцветный раствор над осадком.

Хранят в хорошо закрытой емкости, раствор должен быть прозрачным.

Свинцово-ацетатная бумага.

Фильтровальную бумагу, плотность которой 80 г/м^2, погружают в смесь уксусная кислота разведённая 12 % – раствор свинца(II) ацетата 9,5 % 1:10, затем ее вынимают, сушат и нарезают на полоски размером 15 × 40 мм.

Свинцово-ацетатная вата.

Гигроскопичную вату погружают в смесь растворителей уксусная кислота разведённая 12 % – 9,5 % раствор свинца(II) ацетата 1:10. Не отжимая ваты, удаляют избыток жидкости, затем помещают ее на несколько слоев фильтровальной бумаги и сушат на воздухе.

Хранят в воздухонепроницаемой упаковке.

Свинца(II) нитрат. [10099-74-8]. $Pb(NO_3)_2$. (М.м. 331,21).

Нитрат свинца(II).

Кристаллический порошок белого цвета или бесцветные кристаллы.

Легко растворим в воде.

Свинца(II) нитрата раствор 10 %.

10 г свинца(II) нитрата растворяют в воде и доводят объём раствора водой до 100,0 мл.

Свинца(II) нитрата раствор 3,3 %. Раствор 33 г/л.

Свинца(II) оксид. [1317-36-8]. PbO. (М.м. 223,20).

Оксид свинца(II).

Мелкокристаллический или аморфный порошок от желто-зеленого с серебристым оттенком до красновато-бурого цвета.

Практически нерастворим в воде, растворим в азотной кислоте концентрированной и концентрированных растворах гидроксидов щелочных металлов.

Свинца(IV) оксид. [1309-60-0]. PbO_2. (М.м. 239,20).

Оксид свинца(IV).

Порошок темно-коричневого цвета, выделяющий кислород при нагревании. Практически нерастворим в воде, растворим в хлористоводородной кислоте концентрированной с выделением хлора, растворим в азотной кислоте разведённой 12,5 % в присутствии пероксида водорода, щавелевой кислоты или других восстанавливающих реагентов, растворим в горячих концентрированных растворах гидроксидов щелочных металлов.

Сегнетова соль. См. **Калия-натрия тартрат**.

Селен. [7782-49-2]. Se. (А.м. 78,96). Селен.

Порошок или гранулы от коричневато-красного до черного цвета.

Практически нерастворим в воде и спирте 96 %, растворим в азотной кислоте концентрированной при нагревании.

Температура плавления. Около 220 °С.

Селена(IV) оксид. [7446-08-4]. SeO_2. (М.м. 110,96). Оксид селена(IV).

Белый кристаллический порошок.

Легко растворим в воде, растворим в спирте 96 %, ацетоне, уксусной кислоте.

Селенистая кислота. [7783-00-8]. H_2SeO_3. (М.м. 128,97).

Селенистая кислота.

Кристаллы, расплывающиеся на воздухе. Легко растворима в воде.

Хранят в воздухонепроницаемой упаковке.

Сеньетова соль. См. **Калия-натрия тартрат**.

Сера. [7704-34-9]. S. (А.м. 32,07). Сера.

Мелкий аморфный бледно-желтый порошок, без запаха.

Серебра диэтилдитиокарбамат. [1470-61-7]. $C_5H_{10}AgNS_2$. (М.м. 256,14).

N,*N*-Диэтилдитиокарбамат серебра.

Порошок от бледно-желтого до серовато-желтого цвета.

Практически нерастворим в воде, растворим в пиридине.

Готовят следующим образом: 1,7 г серебра нитрата растворяют в 100 мл воды. Отдельно растворяют 2,3 г натрия диэтилдитиокарбамата в 100 мл воды. Оба раствора охлаждают до температуры 10 °С, смешивают и при перемешивании собирают осадок желтого цвета на стеклянном фильтре, промывают 200 мл холодной воды и сушат в вакууме в течение 2 – 3 ч.

Серебра диэтилдитиокарбамат не должен изменять окраску или иметь сильный запах.

Серебра нитрат. [7761-88-8]. $AgNO_3$. (М.м. 169,87). Нитрат серебра.

Бесцветные прозрачные кристаллы в виде пластинок или белых цилиндрических палочек. Под действием света препарат темнеет.

Очень легко растворим в воде, растворим в спирте 96 %.

Готовят непосредственно перед использованием.

Серебра нитрата раствор 10 %.

10,0 г серебра нитрата помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в воде и доводят объём раствора водой до метки. Срок годности раствора – 6 мес при хранении в сосуде светозащитного стекла с притёртой пробкой в защищённом от света месте.

Серебра нитрата аммиачный раствор 5 %.

5,0 г серебра нитрата растворяют в 100 мл воды. К раствору приливают по каплям, при постоянном перемешивании, 10 % раствор аммиака разведеный до тех пор, пока осадок не будет почти (но не полностью) растворен; фильтруют.

Хранят в хорошо укупоренных сосудах оранжевого стекла в защищенном от света месте.

Серебра нитрата аммиачный раствор 2,5 %.

2,5 г серебра нитрата растворяют в 80 мл воды, по каплям прибавляют 10 % раствор аммиака разведённый до растворения осадка и доводят объём раствора водой до 100,0 мл.

Серебра нитрата раствор 4,25 %. Раствор 42,5 г/л.

Хранят в сосудах оранжевого стекла с притертыми пробками в защищенном от света месте.

Серебра нитрата раствор 2 %. Раствор 20 г/л.

Хранят в сосудах оранжевого стекла с притертыми пробками в защищенном от света месте.

Серебра нитрата раствор 1,7 %. Раствор 17 г/л.

Хранят в сосудах оранжевого стекла с притертыми пробками в защищенном от света месте.

Серебра нитрата спиртовой раствор 2 %. Раствор 20 г/л в спирте 96 %.

Хранят в сосудах оранжевого стекла с притертыми пробками в защищенном от света месте.

Серебра нитрата раствор в пиридине 8,5 %. Раствор 85 г/л в пиридине.

Хранят в сосудах оранжевого стекла с притертыми пробками в защищенном от света месте.

Серебра нитрата реактив.

К смеси 3 мл раствора аммиака концентрированного 32 % и 40 мл 1 М раствора натрия гидроксида прибавляют по каплям при перемешивании 8 мл 2 % раствора серебра нитрата и доводят объём раствора водой до 200,0 мл.

Серебра оксид. [20667-12-3]. Ag_2O. (М.м. 231,74). Оксид серебра(I).

Порошок коричневато-черного цвета.

Практически нерастворим в воде и спирте 96 %, легко растворим в разведённой азотной кислоте и растворах аммиака.

Хранят в защищенном от света месте.

Серебряно-марганцевая бумага.

Полоски медленно фильтрующей бумаги погружают в раствор, содержащий 8,5 г/л марганца(II) сульфата и 8,5 г/л серебра нитрата. Выдерживают в течение нескольких минут, сушат над фосфора(V) оксидом, защищая от воздействия паров кислот и щелочей.

Серная кислота концентрированная. [7664-93-9]. H_2SO_4. (М.м. 98,08). Серная кислота. Содержание H_2SO_4 93,56–95,68 %.

Бесцветная едкая маслянистой консистенции, очень гигроскопичная жидкость. Плотность 1,830–1,835.

Смешивается с водой и спиртом 96 % с интенсивным выделением тепла. При смешивании с другими жидкостями следует осторожно прибавлять серную кислоту концентрированную к другим жидкостям.

Серной кислоты раствор 50 %.

К 500 мл воды осторожно, при помешивании, прибавляют 300 мл серной кислоты концентрированной. Раствор после охлаждения разбавляют водой до плотности 1,398–1,388.

Серной кислоты раствор 25 %.

К 100 мл воды осторожно, при перемешивании, прибавляют 17,0 мл серной кислоты концентрированной.

Серной кислоты раствор 20 %.

К 100 мл воды осторожно, при перемешивании, прибавляют 12,5 мл серной кислоты концентрированной.

Серная кислота разведённая 16 %.

Серной кислоты концентрированной – 1 часть и воды – 5 частей.

В фарфоровый или стеклянный сосуд отвешивают воду и к ней понемногу при помешивании прибавляют кислоту. Содержание H_2SO_4 не менее 15,56 и не более 16,5 %.

Серная кислота разведённая 9,8 %. Содержит 98 г/л H_2SO_4.

5,5 мл серной кислоты концентрированной прибавляют к 60 мл воды, охлаждают и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл.

Количественное определение. В колбу с притертой стеклянной пробкой помещают 30 мл воды, прибавляют 10,0 мл серной кислоты разведённой и титруют 1 М раствором натрия гидроксида, используя в качестве индикатора 0,1 мл 0,05 % раствора метилового красного.

1 мл 1 М раствора натрия гидроксида соответствует 49,04 мг H_2SO_4.

Серной кислоты раствор 5 %.

К 100 мл воды осторожно, при помешивании, прибавляют 3,0 мл серной кислоты концентрированной.

Серной кислоты раствор 2 М.

4 н. раствор серной кислоты.

112,00 мл серной кислоты концентрированной осторожно прибавляют к 200 мл воды и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл.

Серной кислоты раствор 1 М.

2 н. раствор серной кислоты.

56,00 мл серной кислоты концентрированной осторожно прибавляют к 100 мл воды и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл.

Серной кислоты раствор 0,05 М.

0,1 н. раствор серной кислоты.

5,0 мл раствора серной кислоты 1 М помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят объём раствора водой до метки.

Используют свежеприготовленным.

Серная кислота, свободная от азота.

Должна выдерживать требования для серной кислоты концентрированной и следующее дополнительное испытание.

Нитраты. К 5 мл воды осторожно прибавляют 45 мл серной кислоты концентрированной, охлаждают до температуры 40 °С и прибавляют 8 мг дифенилбензидина; полученный раствор должен быть бесцветным или слегка бледно-голубого цвета.

Серной кислоты раствор в уксусном ангидриде 2 %.

Раствор 20 г/л.

Серной кислоты раствор спиртовой 36,6 %.

Осторожно при постоянном охлаждении и перемешивании 20 мл серной кислоты концентрированной прибавляют к 60 мл спирта 96 %, охлаждают и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл.

Готовят непосредственно перед использованием.

Серной кислоты раствор спиртовой 10 %.

Осторожно при постоянном охлаждении и перемешивании 5,5 мл серной кислоты концентрированной прибавляют к 60 мл спирта 96 %, охлаждают и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл.

Готовят непосредственно перед использованием.

Серной кислоты раствор спиртовой 2,5 М.

Осторожно при постоянном охлаждении и перемешивании 14 мл серной кислоты концентрированной прибавляют к 60 мл спирта 96 %, охлаждают и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл.

Готовят непосредственно перед использованием.

Серной кислоты раствор спиртовой 0,25 М.

10 мл 2,5 М спиртового раствора серной кислоты доводят спиртом 96 % до объёма 100,0 мл.

Готовят непосредственно перед использованием.

Сернистой кислоты раствор.

Сернистая кислота весьма неустойчива при хранении и известна только в водных растворах. Готовят ее непосредственно перед употреблением по следующей методике.

Сернистый газ, получаемый при действии прибавляемой по капле серной кислоты концентрированной на сульфит или натрия бисульфит, по газоотводной трубке пропускают через 50–100 мл холодной воды до насыщения. Насыщенный раствор сернистой кислоты при температуре 20 °С содержит около 6 % SO_2 и имеет плотность около 1,0328. Такой раствор разводят водой в 10 раз и применяют для обесцвечивания йода.

Сероводород. [7783-06-4]. H_2S. (М.м. 34,08).

Сульфид водорода.

Газ; мало растворим в воде.

Сероводород очищенный.

Содержит не менее 99,7 % (о/о) H_2S.

Серы диоксид. [7446-09-5]. SO_2. (М.м. 64,04).

Оксид серы(IV).

Бесцветный газ. При сжатии превращается в бесцветную жидкость.

Растворим в спирте 96 %, серной кислоте концентрированной, уксусной кислоте.

Серы диоксид очищенный.

Содержит не менее 99,9 % (о/о) SO_2.

Сероуглерод. См. **Углерода дисульфид**.

Силикагель G.

Состоит из около 87 % кремния диоксида и около 13 % кальция сульфата гемигидрата.

Гомогенный порошок белого цвета с размером частиц около 15 мкм.

Кальция сульфат. 0,25 г помещают в колбу с притертой стеклянной пробкой, прибавляют 3 мл хлористоводородной кислоты разведённой 7,3 % и 100 мл воды, энергично взбалтывают в течение 30 мин, фильтруют через стеклянный фильтр и промывают остаток. Фильтрат и промывные воды объединяют и проводят определение содержания кальция методом комплексонометрии.

1 мл 0,1 М раствора натрия эдетата соответствует 14,51 мг $CaSO_4 \cdot 0{,}5H_2O$.

pH. Около 7,0 (суспензия, полученная взбалтыванием 1 г с 10 мл воды, свободной от углерода диоксида, в течение 5 мин).

Силикагель GF_{254}.

Содержит около 13 % кальция сульфата полугидрата и около 1,5 % флуоресцентного индикатора, имеющего оптимальную интенсивность поглощения при длине волны 254 нм.

Гомогенный порошок белого цвета с размером частиц около 15 мкм.

Кальция сульфат. Определение проводят методом, указанным для силикагеля G.

pH. Должен выдерживать требования для силикагеля G.

Флуоресценция. Определение проводят методом тонкослойной хроматографии, используя в качестве тонкого слоя силикагель GF_{254}. На хроматографическую пластинку наносят в 10 точек последовательно возрастающие объёмы от 1 до 10 мкл 0,1 % раствора бензойной кислоты в

смеси растворителей муравьиная кислота безводная – 2-пропанол 10:90. Хроматографируют в той же смеси растворителей. Когда фронт растворителей пройдет около 10 см, пластинку вынимают, сушат и просматривают в УФ-свете при длине волны 254 нм. На верхней трети хроматограммы на флуоресцирующем фоне должны обнаруживаться темные пятна бензойной кислоты, начиная от 2 мкг и более.

Силикагель H.

Гомогенный порошок белого цвета с размером частиц около 15 мкм.

pH. Должен выдерживать требования для силикагеля G.

Силикагель H силанизированный.

Гомогенный порошок белого цвета; после встряхивания с водой всплывает на поверхность вследствие гидрофобных свойств.

Хроматографическая разделяющая способность. Должен выдерживать испытание для силикагеля HF_{254} силанизированного.

Силикагель HF_{254}.

Содержит около 1,5 % флуоресцентного индикатора, имеющего оптимальную интенсивность поглощения при длине волны 254 нм.

Гомогенный порошок белого цвета с размером частиц около 15 мкм.

pH. Должен выдерживать требование для силикагеля G.

Флуоресценция. Должен выдерживать требование для силикагеля GF_{254}.

Силикагель HF_{254} силанизированный.

Содержит около 1,5 % флуоресцентного индикатора, имеющего оптимальную интенсивность поглощения при длине волны 254 нм.

Гомогенный порошок белого цвета; после встряхивания с водой всплывает на поверхность вследствие гидрофобных свойств.

Хроматографическая разделяющая способность. В коническую колбу вместимостью 250 мл помещают по 0,1 г метиллаурата, метилмиристата, метилпальмитата и метилстеарата, прибавляют 40 мл 3 % спиртового раствора калия гидроксида и нагревают с обратным холодильником при температуре 100 °C в течение 1 ч. Охлаждают, переносят раствор в

делительную воронку с помощью 100 мл воды, подкисляют до pH от 2 до 3 хлористоводородной кислотой разведённой 7,3 % и встряхивают с 3 порциями хлороформа по 10 мл каждая. Объединенные хлороформные извлечения сушат над натрия сульфатом безводным, фильтруют и выпаривают досуха на водяной бане. Остаток растворяют в 50 мл хлороформа. Проводят определение методом тонкослойной хроматографии, используя в качестве тонкого слоя силикагель HF_{254} силанизированный. На хроматографическую пластинку наносят в 3 точки по 10 мкл хлороформного раствора и хроматографируют в системе растворителей уксусная кислота ледяная – вода – диоксан 10:25:65. Когда фронт растворителей пройдет 14 см, пластинку вынимают, сушат при температуре 120 °С в течение 30 мин, охлаждают, опрыскивают раствором 35 г/л фосфорномолибденовой кислоты в 2-пропаноле и нагревают при температуре 150 °С до появления пятен. Пластинку обрабатывают парами аммиака до получения белого фона. На хроматограммах должны обнаруживаться 4 четко разделенных хорошо выраженных пятна.

Силикагель для хроматографии.

Силикагель очень тонко измельченный с размером частиц от 3 мкм до 10 мкм. Размер частиц указывают после названия сорбента в испытаниях, в которых он используется.

Гомогенный порошок белого цвета.

Практически нерастворим в воде и спирте 96 %.

Силикагель для хроматографии, сильный анионит.

Силикагель очень тонко измельченный с размером частиц от 3 до 10 мкм и поверхностью, химически модифицированной группами четвертичного аммония. Размер частиц указывают после названия сорбента в испытаниях, в которых он используется.

Гомогенный порошок белого цвета.

pH. Используемые пределы от 2 до 8.

Силикагель для хроматографии, сильный катионит.

Силикагель, очень тонко измельченный, с размером частиц от 5 до 10 мкм и поверхностью, химически модифицированной сульфогруппами. Размер частиц указывают после названия сорбента в испытаниях, в которых он используется.

Гомогенный порошок белого цвета.

Практически нерастворим в воде и спирте 96 %.

Силикагель для эксклюзионной хроматографии.

Силикагель очень тонко измельченный с размером частиц 10 мкм и очень гидрофильной поверхностью; средний диаметр пор около 30 нм; совместим с водными растворами с pH от 2 до 8 и органическими растворителями.

Пригоден для разделения протеинов с молекулярными массами от $1 \cdot 10^3$ до $3 \cdot 10^5$.

Силикагель, модифицированный амилазой, для хроматографии.

Силикагель очень тонко измельченный с размером частиц 10 мкм и поверхностью, химически модифицированной амилазой. Размер частиц указывают после названия сорбента в испытаниях, в которых он используется.

Гомогенный порошок белого цвета.

Силикагель алкиламидный эндкепированный для хроматографии.

Силикагель с размером частиц от 3 до 10 мкм, с поверхностью, химически модифицированной алкиламидными группами группами и эндкепированный. Размер частиц указывают после названия сорбента в испытаниях, в которых он используется.

Гомогенный порошок белого цвета.

Силикагель аминопропилметилсилильный для хроматографии.

Силикагель очень тонко измельченный с размером частиц от 3 до 10 мкм и поверхностью, химически модифицированной аминопропилметилсилильными группами. Размер частиц указывают после названия сорбента в испытаниях, в которых он используется.

Гомогенный порошок белого цвета.

Силикагель аминопропилсилильный для хроматографии.

Силикагель очень тонко измельченный с размером частиц от 3 до 10 мкм и поверхностью, химически модифицированной аминопропилсилильными группами. Размер частиц указывают после названия сорбента в испытаниях, в которых он используется.

Гомогенный порошок белого цвета.

Силикагель безводный.

Аморфная кремневая кислота, частично обезвоженная и полимеризованная, поглощающая при температуре 20 °С около 30 % воды относительно своей массы. Содержит в качестве индикатора кобальта хлорид.

Практически нерастворим в воде, частично растворим в растворах натрия гидроксида.

Силикагель бутилсилильный для хроматографии.

Силикагель очень тонко измельченный с размером частиц от 3 до 10 мкм и поверхностью, химически модифицированной бутилсилильными группами. Размер частиц указывают после названия сорбента в испытаниях, в которых он используется.

Гомогенный порошок белого цвета.

Кремния диоксид сфероидальный. 30 нм.

Объём пор. 0,6 $см^3$/г.

Удельная площадь поверхности. 80 $м^2$/г.

Силикагель бутилсилильный эндкепированный для хроматографии.

Очень тонко измельченный с размером частиц от 3 мкм до 10 мкм, химически модифицированный бутилсилильными группами. Для сведения к минимуму какого-либо взаимодействия с основными соединениями, тщательно эндкепируют для устранения большинства оставшихся силанольных групп. Размер частиц указывается после названия реагента в тестах, где он используется.

Мелкий, белый или почти белый однородный порошок, практически нерастворимый в воде и в этаноле (96 процентов).

Силикагель гексилсилильный для хроматографии.

Силикагель очень тонко измельченный с размером частиц от 3 мкм до 10 мкм и поверхностью, химически модифицированной гексилсилильными группами. Размер частиц указывают после названия сорбента в испытаниях, в которых он используется.

Гомогенный порошок белого цвета.

Силикагель гидрофильный для хроматографии.

Силикагель очень тонко измельченный с размером частиц от 3 до 10 мкм, поверхность которого модифицирована с целью придания гидрофильных свойств. Размер частиц указывают после названия сорбента в испытаниях, в которых он используется.

Силикагель диизобутилоктадецилсилильный для хроматографии.

Силикагель очень тонко измельченный с поверхностью, химически модифицированной диизобутилоктадецилсилильными группами. Размер частиц указывают после названия сорбента в испытаниях, в которых он используется.

Гомогенный порошок белого цвета.

Силикагель диметилоктадецилсилильный для хроматографии.

Силикагель очень тонко измельченный с размером частиц от 3 до 10 мкм и поверхностью, химически модифицированной диметилоктадецилсилильными группами. Размер частиц указывают после названия сорбента в испытаниях, в которых он используется.

Гомогенный порошок белого цвета.

Размер частиц иррегулярный. Удельная площадь поверхности 300 $м^2$/г.

Силикагель диольный для хроматографии (1).

Сферические частицы кремния диоксида с привитыми дигидроксипропильными группами. Размер пор 10 нм.

Силикагель додецилсилильный для хроматографии.

Силикагель очень тонко измельченный с поверхностью, химически модифицированной додецилсилильными группами. Размер частиц указывают после названия сорбента в испытаниях, в которых он используется.

Гомогенный порошок белого цвета.

Силикагель модифицированный альбумином для хиральной хроматографии.

Силикагель тонко измельченный с размером частиц от 3 до 10 мкм и поверхностью, модифицированной бычьим альбумином.

Силикагель модифицированный α_1-кислотным гликопротеином для хиральной хроматографии.

Силикагель тонко измельченный с размером частиц 5 мкм и поверхностью, модифицированной α_1-кислотным гликопротеином.

Силикагель модифицированный трис(3,5-диметилфенилкарбамоил)амилозой для хиральной хроматографии.

Силикагель с размером частиц от 3 до 10 мкм и поверхностью, модифицированной трис(3,5-диметилфенилкарбамоил)амилозой.

Силикагель модифицированный трис(3,5-диметифенилкарбамоил)целлюлозой для хиральной хроматографии.

Силикагель с размером частиц от 3 до 20 мкм и поверхностью, модифицированной трис(3,5-диметифенилкарбамоил)целлюлозой.

Силикагель модифицированный трис(4-метилбензоил)целлюлозой для хиральной хроматографии.

Силикагель с размером частиц от 3 до 10 мкм и поверхностью, модифицированной трис(4-метилбензоил)целлюлозой.

Силикагель модифицированный трис(фенилкарбамоил)целлюлозой для хиральной хроматографии.

Силикагель с размером частиц от 3 до 10 мкм и поверхностью, модифицированной трис(4-метилбензоил)целлюлозой.

Силикагель нитрильный для хроматографии.

Силикагель очень тонко измельченный с поверхностью, химически модифицированной цианопропилсилильными группами. Размер частиц указывают после названия сорбента в испытаниях, в которых он используется.

Гомогенный порошок белого цвета.

Силикагель нитрильный для хроматографии (1).

Силикагель очень тонко измельченный, состоящий из пористых сферических частиц, с химически связанными нитрильными группами. Размер частиц указывают после названия сорбента в испытаниях, в которых он используется.

Гомогенный порошок белого цвета.

Силикагель нитрильный для хроматографии (2) (сверхчистый).

Силикагель сверхчистый с поверхностью, химически модифицированной цианопропилсилильными группами. Содержит менее 20 ppm металлов. Размер частиц указывают после названия сорбента в испытаниях, в которых он используется.

Гомогенный порошок белого цвета.

Силикагель октадеканоиламинопропилсилильный для хроматографии.

Силикагель тонкоизмельченный с размером частиц от 3 до 10 мкм и поверхностью, химически модифицированной аминопропилсилильными группами, которые ацилированы октадеканоилгруппами. Размер частиц указывают после названия сорбента в испытаниях, в которых он используется.

Гомогенный порошок белого цвета.

Силикагель октадецилсилильный для хроматографии.

Силикагель очень тонко измельченный с размером частиц от 3 до 10 мкм и поверхностью, химически модифицированной октадецилсилильными группами. Размер частиц указывают после названия сорбента в испытаниях, в которых он используется.

Гомогенный порошок белого цвета.

Силикагель октадецилсилильный для хроматографии (1) (сверхчистый). Силикагель сверхчистый, очень тонко измельченный с размером пор около 10 нм и поверхностью, химически модифицированной октадецилсилильными группами (содержание углерода 19 %).

Содержание металлов должно быть менее 20 ppm.

Силикагель октадецилсилильный для хроматографии (2) (сверхчистый). Силикагель сверхчистый, очень тонко измельченный с размером пор 15 нм и поверхностью, химически модифицированной октадецилсилильными группами (содержание углерода 20 %), предназначенный для анализа полициклических ароматических углеводородов. Размер частиц указывают после названия сорбента в испытаниях, в которых он используется.

Гомогенный порошок белого цвета.

Силикагель октадецилсилильный, деактивированный по отношению к основаниям, для хроматографии.

Силикагель очень тонко измельченный с размером частиц от 3 до 10 мкм; перед введением октадецилсилильных групп его предварительно обрабатывают путем тщательного промывания и гидролиза большинства поверхностных силоксановых мостиков для сведения к минимуму взаимодействия с основными компонентами. Размер частиц указывают после названия сорбента в испытаниях, в которых он используется.

Гомогенный порошок белого цвета.

Силикагель октадецилсилильный, деактивированный по отношению к основаниям, эндкепированный для хроматографии.

Силикагель очень тонко измельченный с размером частиц от 3 до 10 мкм и размером пор около 10 нм, содержит около 16 % углерода. Перед введением октадецилсилильных групп его предварительно обрабатывают путем тщательного промывания и гидролиза большинства поверхностных силоксановых мостиков. Для дальнейшего сведения к минимуму какого-либо взаимодействия с основными соединениями тщательно эндкепируют для

устранения большинства оставшихся силанольных групп. Размер частиц указывают после названия сорбента в испытаниях, в которых он используется.

Гомогенный порошок белого цвета.

Силикагель октадецилсилильный, деактивированный по отношению к основаниям, эндкепированный для хроматографии (1).

Силикагель очень тонко измельченный с размером частиц от 3 до 10 мкм. Перед введением октадецилсилильных групп его предварительно обрабатывают путем тщательного промывания и гидролиза большинства поверхностных силоксановых мостиков. Для дальнейшего сведения к минимуму какого-либо взаимодействия с основными соединениями тщательно эндкепируют для устранения большинства оставшихся силанольных групп. Размер частиц указывают после названия сорбента в испытаниях, в которых он используется.

Гомогенный порошок белого цвета.

Силикагель октадецилсилильный, эндкепированный для хроматографии.

Силикагель очень тонко измельченный с размером частиц от 3 до 10 мкм и поверхностью, химически модифицированной октадецилсилильными группами. Для сведения к минимуму взаимодействия с основными компонентами эндкепирован для закрытия большинства оставшихся силанольных групп. Размер частиц указывают после названия сорбента в испытаниях, в которых он используется.

Гомогенный порошок белого цвета.

Силикагель октадецилсилильный, эндкепированный для хроматографии (1) (сверхчистый).

Силикагель очень тонко измельченный с размером пор около 10 нм и поверхностью, химически модифицированной октадецилсилильными группами (содержание углерода 20 %). Для сведения к минимуму взаимодействия с основными компонентами эндкепирован для закрытия

большинства оставшихся силанольных групп. Размер частиц указывают после названия сорбента в испытаниях, в которых он используется.

Содержание металлов должно быть менее 20 ppm.

Силикагель октадецилсилильный монолитный для хроматографии.

Монолитные стержни высокопористые (более 80 %) из силикагеля с бимодальной структурой пор; модифицированы на поверхности октадецилсилильными группами.

Силикагель октилсилильный для хроматографии.

Силикагель очень тонко измельченный с размером частиц от 3 до 10 мкм и поверхностью, химически модифицированной октилсилильными группами. Размер частиц указывают после названия сорбента в испытаниях, в которых он используется.

Гомогенный порошок белого цвета.

Силикагель октилсилильный для хроматографии (1).

Силикагель очень тонко измельченный с размером частиц от 3 до 10 мкм и поверхностью, химически модифицированной октилсилильными и метильными группами. Размер частиц указывают после названия сорбента в испытаниях, в которых он используется.

Гомогенный порошок белого цвета.

Силикагель октилсилильный для хроматографии (2).

Силикагель очень тонко измельченный с размером пор 10 и поверхностью, химически модифицированной октилсилильными группами (содержит 19 % углерода).

Силикагель октилсилильный, деактивированный по отношению к основаниям, для хроматографии.

Силикагель очень тонко измельченный с размером частиц от 3 до 10 мкм; перед введением октилсилильных групп его предварительно обрабатывают путем тщательного промывания и гидролиза большинства поверхностных силоксановых мостиков для сведения к минимуму взаимодействия с

основными компонентами. Размер частиц указывают после названия сорбента в испытаниях, в которых он используется.

Гомогенный порошок белого цвета.

Силикагель октилсилильный эндкепированный для хроматографии.

Силикагель очень тонко измельченный с размером частиц от 3 до 10 мкм и поверхностью, химически модифицированной октилсилильными группами. Для сведения к минимуму взаимодействия с основными соединениями тщательно эндкепируют для устранения большинства оставшихся силанольных групп. Размер частиц указывают после названия сорбента в испытаниях, в которых он используется.

Гомогенный порошок белого цвета.

Силикагель октилсилильный, деактивированный по отношению к основаниям, эндкепированный для хроматографии.

Силикагель очень тонко измельченный с размером частиц от 3 до 10 мкм. Перед введением октилсилильных групп его предварительно обрабатывают путем тщательного промывания и гидролиза большинства поверхностных силоксановых мостиков. Для дальнейшего сведения к минимуму какого-либо взаимодействия с основными соединениями тщательно эндкепируют для устранения большинства оставшихся силанольных групп. Размер частиц указывают после названия сорбента в испытаниях, в которых он используется.

Гомогенный порошок белого цвета.

Силикагель триметилсилильный для хроматографии.

Силикагель очень тонко измельченный с размером частиц от 3 до 10 мкм и поверхностью, химически модифицированной триметилсилильными группами. Размер частиц указывают после названия сорбента в испытаниях, в которых он используется.

Гомогенный порошок белого цвета.

Силикагель фенилсилильный для хроматографии.

Силикагель очень тонко измельченный с размером частиц от 5 до 10 мкм и поверхностью, химически модифицированной фенильными группами.

Силикагель фенилсилильный для хроматографии (1).

Силикагель очень тонко измельченный с размером частиц 5 мкм и поверхностью, химически модифицированной фенильными группами.

Размер частиц указывают после названия сорбента в испытаниях, в которых он используется.

Гомогенный порошок белого цвета.

Практически нерастворим в воде, спирте 96 % и метиленхлориде.

Кремния диоксид сфероидальный. 8 нм.

Удельная площадь поверхности. 180 $м^2$/г.

Содержание углерода. 5,5 %.

Силикагель цианосилильный для хроматографии.

Силикагель очень тонко измельченный с поверхностью, химически модифицированной цианосилильными группами. Размер частиц указывают после названия сорбента в испытаниях, в которых он используется.

Гомогенный порошок белого цвета.

Синенсетин. [2306-27-6]. $C_{20}H_{20}O_7$. (М.м. 372,37).

2-(3,4-Диметоксифенил)-5,6,7-триметокси-4*H*-1-бензопиран-4-он.

Белый кристаллический порошок.

Практически нерастворим в воде, растворим в спирте 96 %.

Температура плавления. Около 177 °С.

Поглощение. Раствор в метаноле имеет 3 максимума поглощения при 243, 268 и 330 нм.

Количественное содержание. Не менее 95,0 %.

Синий VS. См. **Сульфановый синий**.

Сквалан. [111-01-3]. $C_{30}H_{62}$. (М.м. 422,8).

2,6,10,15,19,23-Гексаметилтетракозан.

Бесцветная маслянистая жидкость.

Легко растворим в эфире и жирных маслах, мало растворим в ацетоне, спирте 96 %, уксусной кислоте ледяной и метаноле.

d_{20}^{20}. От 0,811 до 0,813.

n_D^{20}. От 1,451 до 1,453.

Скипидар очищенный.

Прозрачная бесцветная подвижная жидкость с характерным запахом.

Смешанный индикатор.

Смешивают метиловый красный и метиленовый синий в соотношении 2:1.

Смешанного индикатора раствор.

100 мл 0,1 % спиртового раствора метилового красного смешивают с 50 мл 0,1 % спиртового раствора метиленового синего (голубого).

Переход окраски раствора от фиолетово-красной к зеленой при pH 5,4.

Смесь для спекания.

25 г мелко растертого безводного химически чистого натрия карбоната тщательно смешивают в ступке с 45 г безводного химически чистого калия карбоната и с 25 г мелко растертого химически чистого калия нитрата.

Хранят в банке с притертой пробкой.

Смола слабокатионитная. См. **Анионобменная смола**.

Смола ионообменная сильнокислотная. См. **Ионообменная смола сильнокислотная**.

Соль Рейнеке. См. **Аммония рейнекат**.

Сополимер стирол-дивинилбензола.

Твердые, пористые гранулы из поперечно-сшитого полимера. Существуют различные марки с разными размерами гранул. Размер гранул указывают после названия реактива в испытаниях, в которых он используется.

Сополимер этилвинилбензол-дивинилбензола.

Твердые, пористые гранулы шарообразной формы из поперечно-сшитого полимера. Существуют различные марки с разными размерами гранул. Размер гранул указывают в испытаниях, в которых он используется.

Сорбит. [50-70-4]. $C_6H_{14}O_6$. (М.м. 182,17). D-Глюцит.

Белый или почти белый кристаллический порошок. Обладает полиморфизмом.

Очень легко растворим в воде, практически нерастворим в спирте 96 %.

Спирт 95 %. [64-17-5]. C_2H_6O. (М.м. 46,07).

Этанол.

Содержит 94,9 – 96,0 % (о/о) или 92,3 – 93,8 % (м/м) C_2H_6O при температуре 20 °С.

Бесцветная, прозрачная, летучая, воспламеняющаяся жидкость; гигроскопична.

Смешивается с водой и метиленхлоридом. Горит бездымным голубоватым пламенем.

Температура кипения. Около 78 °С.

Спирт 96 %. [64-17-5]. C_2H_6O. (М.м. 46,07).

Этанол.

Содержит 95,1 – 96,9 % (о/о) или 92,6 – 95,2 % (м/м) C_2H_6O при температуре 20 °С.

Бесцветная, прозрачная, летучая, воспламеняющаяся жидкость; гигроскопична.

Смешивается с водой и метиленхлоридом. Горит бездымным голубоватым пламенем.

Температура кипения. Около 78 °С.

Спирт 96 %, свободный от альдегидов.

1200 мл спирта 96 % смешивают с 5 мл 40 % раствора серебра нитрата и 10 мл охлажденного 50 % раствора калия гидроксида, встряхивают, отстаивают в течение нескольких дней и фильтруют.

Фильтрат перегоняют непосредственно перед использованием.

Спирт 96 % очищенный.

К 1 л 95 % спирта прибавляют 4 г цинковой пыли и 4 мл серной кислоты концентрированной. Смесь оставляют на 24 ч, периодически перемешивая.

Затем спирт перегоняют. К 1 л перегнанного спирта прибавляют 4 г цинковой пыли и 4 г калия гидроксида, перемешивают и снова перегоняют.

Спирт 96 %, содержащий 1 % хлористоводородной кислоты концентрированной.

К 80 мл спирта 96 % осторожно прибавляют по каплям 5,6 г хлористоводородной кислоты концентрированной и доводят объём раствора спиртом 96 % до 100,0 мл.

Раствор используют свежеприготовленным.

Спирт 90 %.

К 94 мл спирта 96 % прибавляют 7 мл воды дистиллированной и перемешивают.

Спирт 90 %, содержащий 1 % хлористоводородной кислоты концентрированной.

К 80 мл спирта 90 % осторожно прибавляют по каплям 5,6 г хлористоводородной кислоты концентрированной и доводят объём раствора спиртом 90 % до 100,0 мл.

Раствор используют свежеприготовленным.

Спирт 70 %.

К 73 мл спирта 96 % прибавляют 30 мл воды дистиллированной и перемешивают.

Спирт 60 %.

К 62,5 мл спирта 96 % 40,5 мл воды дистиллированной и перемешивают.

Спирт 60 %, содержащий 5 % хлористоводородной кислоты.

К 126 мл спирта 96 % прибавляют 28 г хлористоводородной кислоты концентрированной, доводят объём раствора водой до 200 мл.

Спирт 60 %, содержащий 1 % хлористоводородной кислоты. К 126 мл спирта 96 % прибавляют 5,6 г хлористоводородной кислоты концентрированной, доводят объём раствора водой до 200 мл.

Спирт 50 %. К 52,1 мл спирта 96 % прибавляют 50,9 мл воды дистиллированной и перемешивают.

Спирт *н*-амиловый. См. **Пентанол**.

Спирт *н*-бутиловый. См. **Бутанол**.

Спирт изоамиловый. См. **Изоамиловый спирт**.

Спирт изопропиловый. См. **2-Пропанол**.

Спирт метиловый. См. **Метанол**.

Спирт поливиниловый. См. **Поливиниловый спирт**.

Спирт пропиловый. См. **Пропанол**.

Спирт этиловый абсолютированный. См. **Этанол**.

Спирт этиловый абсолютированный для спектрофотометрии.

Абсолютированный спирт, не содержащий бензола, перегоняют над твердым натрия кидроксидом или калия гидроксидом (10 г щелочи на 1 л спирта). Начальную и конечную порции отгона отбрасывают. Перегнанный спирт абсолютированный при измерении относительно воды в кювете с толщиной слоя 1 см должен иметь величину оптической плотности, не превышающей 0,01 в области от 320 до 350 нм и 0,05 в области от 280 до 300 нм.

Сплав Деварда.

Сплав меди, алюминия и цинка в массовом соотношении 50 %, 45 %, 5 % соответственно.

Белый хрупкий металл в виде палочек или серого порошка.

Стеариновая кислота. [57-11-4]. $C_{18}H_{36}O_2$. (М.м. 284,48).

Октадекановая кислота.

Порошок или хлопья белого цвета, маслянистые на ощупь.

Практически нерастворима в воде, растворима в горячем спирте 96 % и эфире.

Температура плавления. Около 70 °С.

Стронция карбонат. [1633-05-2]. $SrCO_3$. (М.м. 147,63). Карбонат стронция.

Кристаллический порошок белого цвета.

Содержит не менее 99,5 % $SrCO_3$.

Судан красный G. [1229-55-6]. $C_{17}H_{14}N_2O_2$. (М.м. 278,31).

1-[(2-Метоксифенил)диазенил]нафталин-2-ол.

Порошок красновато-коричневого цвета.

Практически нерастворим в воде.

Хроматография. Определение проводят методом тонкослойной хроматографии, используя в качестве тонкого слоя силикагель G. На хроматографическую пластинку наносят 10 мкл 0,01 % раствора в метиленхлориде и хроматографируют в том же растворителе. Длина пробега фронта растворителя около 10 см от линии старта. На полученной хроматограмме должно обнаруживаться только одно основное пятно.

Судан I. [842-07-9]. $C_{16}H_{12}N_2O$. (М.м. 248,28).

1-(Фенилдиазенил)нафталин-2-ол.

Порошок оранжево-красного цвета.

Практически нерастворим в воде, растворим в метиленхлориде.

Температура плавления. Около 131 °С.

Судан III. [85-86-9]. $C_{22}H_{16}N_4O$. (М.м. 352,39).

1-{[4-(Фенилдиазенил)фенил]диазенил}нафталин-2-ол.

Коричневый порошок с зеленым металлическим блеском.

Мало растворим в спирте 96 %, растворим в бензоле и хлороформе.

Судана III раствор 0,3 %.

0,3 г реактива растворяют в 100 мл спирта 70 %, нагревают до закипания. Кипятят в течение 3 – 5 мин, затем охлаждают и фильтруют. Доводят объём раствора спиртом 70 % до 100 мл.

Судан IV. [85-83-6]. $C_{24}H_{20}N_4O$. (М.м. 380,44).

1-({2-Метил-4-[(2-метилфенил)диазенил]фенил}диазенил)нафталин-2-ол.

Порошок от коричневого до красновато-коричневого цвета.

Мало растворим в этаноле 96 %, растворим в хлороформе.

Судана IV раствор 0,5 %.

0,5 г реактива растворяют в хлороформе и доводят объём раствора хлороформом до 100 мл.

Сулема. См. **Ртути(II) хлорид**.

Сульфаминовая кислота. [5329-14-6]. NH_2SO_3H. (М.м. 97,09).

Сульфаминовая кислота.

Кристаллический порошок или кристаллы белого цвета.

Легко растворима в воде, умеренно растворима в ацетоне, спирте 96 % и метаноле, практически нерастворима в эфире.

Температура плавления. Около 205 °С с разложением.

Сульфаминовой кислоты раствор 10 %.

10,0 г сульфаминовой кислоты растворяют в воде и доводят объём раствора водой до 100,0 мл.

Раствор используют свежеприготовленным.

Сульфаминовой кислоты раствор 3 %.

3,0 г сульфаминовой кислоты растворяют в воде и доводят объём раствора водой до 100,0 мл.

Раствор используют свежеприготовленным.

Сульфаниламид. [63-74-1]. $C_6H_8N_2O_2S$. (М.м. 172,20).

4-Аминобензолсульфонамид.

Порошок белого цвета.

Мало растворим в воде, легко растворим в кипящей воде, ацетоне, растворим разведённых неорганических кислотах и растворах гидроксидов щелочных металлов, умеренно растворим в спирте 96 %, эфире и петролейном эфире.

Температура плавления. Около 165 °С.

Сульфаниловая кислота. [121-57-3]. $C_6H_7NO_3S$. (М.м. 173,19). 4-Аминобензолсульфоновая кислота.

Белый или белый с сероватым оттенком кристаллический порошок.

Умеренно растворима в воде, практически нерастворима в 96 % спирте.

Сульфановый синий. [129-17-9]. $C_{27}H_{31}N_2NaO_6S_2$. (М.м. 566,7).

4-{[4-(Диэтиламино)фенил][4-(диэтилазанийилиден)циклогекса-2,5-диен-1-илиден]метил}бензол-1,3-дисульфонат натрия (1:1).

Порошок фиолетового цвета.

Растворим в воде. Разведённые растворы имеют синюю окраску, которая переходит в желтую при прибавлении кислоты хлористоводородной концентрированной.

Сульфарсазен. См. **Плюмбон**.

Сульфатиазол. [72-14-0]. $C_9H_9N_2O_2S_2$. (М.м. 255,32).

4-Амино-*N*-(1,3-тиазол-2-ил)бензолсульфонамид.

Порошок или кристаллы белого или желтовато-белого цвета.

Очень мало растворим в воде, растворим в ацетоне, мало растворим в спирте 96 %. Растворяется в разведённых неорганических кислотах, растворах гидроксидов и карбонатов щелочных металлов.

Температура плавления. Около 200 °С.

Сульфомолибденовый реактив 0,5 %.

Около 50 мг аммония молибдата растворяют в 10 мл кислоты серной концентрированной.

Сульфомолибденовый реактив 2,5 %.

2,5 г аммония молибдата растворяют при нагревании в 20 мл воды. 28 мл кислоты серной концентрированной доводят водой до объёма 50 мл, затем охлаждают. Оба раствора смешивают и доводят объём раствора водой до 100 мл.

Хранят в полиэтиленовой упаковке.

Сульфосалициловая кислота. [5965-83-3]. $C_7H_6O_6S \cdot 2H_2O$. (М.м. 254,21).

2-Гидрокси-5-сульфобензойная кислота, дигидрат.

Кристаллический порошок или кристаллы белого цвета.

Очень легко растворима в воде и спирте 96 %, растворима в эфире.

Температура плавления. Около 109 °С.

Сульфосалициловой кислоты раствор 20 %.

20 г сульфосалициловой кислоты растворяют в воде, доводят объём раствора водой до 100 мл.

Сульфосалициловой кислоты раствор 10 %.

10 г сульфосалициловой кислоты растворяют в воде, доводят объём раствора водой до 100 мл.

Сурьмы(III) хлорид. [10025-91-9]. $SbCl_3$. (М.м. 228,12).

Хлорид сурьмы(III).

Бесцветные кристаллы или прозрачная кристаллическая масса. Гигроскопичен.

Легко растворим в этаноле безводном; гидролизуется в воде.

Хранят в воздухонепроницаемой упаковке, защищают от влаги.

Сурьмы(III) хлорида раствор 30 %.

30 г сурьмы(III) хлорида быстро промывают 2 порциями по 15 мл хлороформа, свободного от этанола, отбрасывают промывные растворы и промытые кристаллы тотчас растворяют при слабом нагревании в 100 мл хлороформа, свободного от этанола.

Хранят раствор над натрия сульфатом безводным.

Сурьмы(III) хлорида раствор в этиленхлориде (около 20 %).

Раствор I. 110 г сурьмы(III) хлорида растворяют в 400 мл этиленхлорида, прибавляют 2,0 г алюминия оксида безводного, перемешивают и фильтруют через стеклянный фильтр (40). Доводят объём фильтрата этиленхлоридом до 500 мл и перемешивают. Оптическая плотность полученного раствора, измеренная при длине волны 500 нм в кювете с толщиной слоя 2 см, не должна превышать 0,07.

Раствор II. В вытяжном шкафу смешивают 100 мл свежеперегнанного ацетилхлорида и 400 мл этиленхлорида.

Хранят в прохладном месте.

Смешивают 90 мл раствора I и 10 мл раствора II.

Хранят во флаконах оранжевого стекла с притертой пробкой.

Срок годности 7 сут. Реактив не годен при появлении окрашивания.

Сурьмы(III) хлорида раствор в хлороформе (≈ 22 %).

Хлороформ промывают 2 – 3 раза равными объёмами воды и сушат над прокаленным калия карбонатом; высушенный хлороформ сливают и перегоняют, отбрасывая первые 10 мл дистиллята. Во время высушивания и перегонки хлороформ следует защищать от воздействия света. Сурьмы трихлорид промывают перегнанным высушенным хлороформом до тех пор, пока промывной хлороформ не будет бесцветным.

Очищенный хлороформ насыщают при температуре 20 °С промытым сурьмы трихлоридом.

Смешивают 1 мл раствора сурьмы трихлорида с 2 г сеньетовой соли и титруют 0,1 М раствором йода до желтого окрашивания.

1 мл 0,1 М раствора йода соответствует 0,01141 г $SbCl_3$, которого в растворе должно быть не менее 21,0 % и не более 23,0 %.

Тагатоза. [87-81-0]. $C_6H_{12}O_6$. (М.м. 180,16).

D-*ликсо*-Гекс-2-улоза.

Порошок белого цвета. Растворима в воде.

$[\alpha]_D^{20}$. – 2,3° (2,19 % раствор).

Температура плавления. От 134 до 135 °С.

Таллия сульфат. [7446-18-6]. Tl_2SO_4. (М.м. 504,8). Сульфат таллия(I).

Ромбовидные призмы белого цвета.

Мало растворим в воде, практически нерастворим в спирте 96 %.

Таниновая кислота. [1401-55-4]. $C_{76}H_{52}O_{46}$. (М.м. 1701,2).

{3,4-Дигидрокси-5-[(3,4,5-тригидроксибензоил)окси]бензоил}-2,3,4,6-тетра-*О*-{3,4-дигидрокси-5-[(3,4,5-тригидроксибензоил)окси]бензоил}-β-D-глюкопиранозид.

Блестящие чешуйки или аморфный порошок от желтоватого до светло-коричневого цвета.

Очень легко растворима в воде, легко растворима в спирте 96 %, растворима в ацетоне, практически нерастворима в эфире.

Хранят в защищенном от света месте.

Таниновой кислоты раствор 10 %.

1 г таниновой кислоты растворяют в 1 мл спирта 96 % и доводят объём раствора водой до 10 мл.

Раствор используют свежеприготовленным.

Твин-20. См. **Полисорбат 20**.

Твин-80. См. **Полисорбат 80**.

γ-Терпинен. [99-85-4]. $C_{10}H_{16}$. (М.м. 136,23).

4-Метил-1-(пропан-2-ил)циклогекса-1,4-диен.

Маслянистая жидкость.

d_4^{15}. Около 0,850.

n_D^{15}. От 1,474 до 1,475.

Температура кипения. От 183 до 186 °С.

Хроматографическая чистота γ-терпинена, используемого в газовой хроматографии, должна быть не менее 93,0 %.

Терпинен-4-ол. [562-74-3]. $C_{10}H_{18}O$. (М.м. 154,25). (1*RS*)-4-Метил-1-(пропан-2-ил)циклогекс-3-ен-1-ол.

Бесцветная маслянистая жидкость.

d_{20}^{20}. Около 0,934.

n_D^{20}. Около 1,477.

Температура кипения. От 209 до 212 °С.

Хроматографическая чистота терпинен-4-ола, используемого в газовой хроматографии, должна быть не менее 98,0 %.

α-Терпинеол. [98-55-5]. $C_{10}H_{18}O$. (М.м. 154,24). 2-[(1*RS*)-4-Метилциклогекс-3-ен-1-ил]пропан-2-ол.

Бесцветные кристаллы.

Практически нерастворим в воде, растворим в спирте 96 % и эфире.

d_{20}^{20}. Около 0,935.

n_D^{20}. Около 1,483.

$[\alpha]_D^{20}$. Около 92,5°.

Температура плавления. Около 35 °С.

Может содержать от 1 до 3 % β-терпинеола.

Хроматографическая чистота α-терпинеола, используемого в газовой хроматографии, должна быть не менее 97,0 %.

Тетрабутиламмония бромид. [1643-19-2]. $C_{16}H_{36}BrN$. (М.м. 322,37).

N,*N*,*N*-Трибутилбутан-1-аминий бромид.

Кристаллы белого или почти белого цвета.

Температура плавления. От 102 до 104 °С.

Тетрабутиламмония гидроксид. См. **Тетрабутиламмония гидроксид 30-водный**.

Тетрабутиламмония гидроксид 30-водный. [147741-30-8].

$C_{16}H_{37}NO \cdot 30H_2O$.

(М.м. 799,9).

N,*N*,*N*-Трибутилбутан-1-аминий гидроксид триаконтагидрат.

Содержит не менее 98,0 % $C_{16}H_{37}NO \cdot 30H_2O$.

Кристаллы белого или почти белого цвета.

Растворим в воде.

Тетрабутиламмония гидроксида раствор 10,4 %. [2052-49-5].

Раствор, содержащий 104 г/л $C_{16}H_{37}NO$ (М.м. 259,47), приготовленный разведением реактива соответствующей степени чистоты.

Тетрабутиламмония гидроксида раствор 40 %. [2052-49-5].

Раствор, содержащий 400 г/л $C_{16}H_{37}NO$ (М.м. 259,47), приготовленный разведением реактива соответствующей степени чистоты.

Тетрабутиламмония гидросульфат. [32503-27-8]. $C_{16}H_{37}NO_4S$.

(М.м. 339,53).

N,*N*,*N*-Трибутилбутан-1-аминий гидросульфат.

Кристаллический порошок или бесцветные кристаллы.

Легко растворим в воде и метаноле.

Температура плавления. От 169 до 173 °С.

Оптическая плотность. Не более 0,05; измеряют оптическую плотность 5 % раствора в области длин волн от 240 до 300 нм.

Тетрабутиламмония гидросульфата раствор 1%.

10,0 г тетрабутиламмония гидросульфата помещают в мерную колбу вместимостью 1 л, прибавляют 800 мл воды, перемешивают до полного растворения, доводят объём раствора водой до метки и фильтруют.

Используют свежеприготовленным.

Тетрабутиламмония гидросульфата раствор 0,08 М.

27,2 г тетрабутиламмония гидросульфата помещают в мерную колбу вместимостью 1 л, прибавляют 800 мл воды, перемешивают до полного растворения, доводят объём раствора водой до метки и фильтруют.

Используют свежеприготовленным.

Тетрабутиламмония дигидрофосфат. [5574-97-0]. $C_{16}H_{38}NO_4P$. (М.м. 339,45). *N*,*N*,*N*-Трибутилбутан-1-аминий дигидрофосфат.

Порошок белого цвета, гигроскопичен.

pH. Около 7,5 (17 % раствор).

Оптическая плотность. Около 0,10; измеряют оптическую плотность 17 % раствора при длине волны 210 нм.

Хранят в воздухонепроницаемой упаковке.

Тетрабутиламмония йодид. [311-28-4]. $C_{16}H_{36}IN$. (М.м. 369,37).

N,*N*,*N*-Трибутилбутан-1-аминий иодид.

Содержит не менее 98,0 % $C_{16}H_{36}IN$.

Кристаллический порошок или кристаллы белого цвета или слегка окрашены.

Растворим в спирте 96 %.

Тетрабутиламмония перхлорат. [1923-70-2]. $C_{16}H_{36}ClNO_4$. (М.м. 341,91).

N,*N*,*N*-Трибутилбутан-1-аминий перхлорат.

Содержит не менее 98,0 % $C_{16}H_{36}ClNO_4$.

Тетрагексиламмония гидросульфат. [32503-34-7]. $C_{24}H_{53}NO_4S$.

(М.м. 451,7).

N,*N*,*N*-Тригексилгексан-1-аминий гидросульфат.

Белые кристаллы.

Температура плавления. От 100 до 102 °С.

Тетрагептиламмония бромид. [4368-51-8]. $C_{28}H_{60}BrN$. (М.м. 490,7).

N,*N*,*N*-Тригептилгептан-1-аминий бромид.

Кристаллический порошок или кристаллы белого цвета или слегка окрашены.

Температура плавления. От 89 до 91 °С.

Тетрагидрофуран. [109-99-9]. C_4H_8O. (М.м. 72,11).

Оксолан.

Прозрачная, бесцветная, воспламеняющаяся жидкость.

Смешивается с водой, спиртом 96 % и эфиром.

Температура кипения. 66 °С.

d_{20}^{20}. Около 0,89.

n_D^{20}. Около 1,407.

Не перегоняют, если тетрагидрофуран не выдерживает испытание на пероксиды.

Пероксиды. 8 мл раствора крахмала с калия йодидом помещают в цилиндр с притертой пробкой емкостью 12 мл и диаметром около 1,5 см, заполняют полностью тетрагидрофураном, затем перемешивают и выдерживают в темном месте в течение 30 мин. Не должно наблюдаться окрашивание.

Тетрагидрофуран, используемый в спектрофотометрии, должен выдерживать следующее дополнительное испытание.

Минимальное пропускание. 20 % при длине волны 255 нм; 80 % при длине волны 270 нм; 98 % при длине волны 310 нм.

Определение проводят, используя в качестве раствора сравнения воду.

Тетрагидрофуран, очищенный от пероксидных соединений.

1,0 л тетрагидрофурана встряхивают в течение 10 мин со 100 г олова(II) хлорида, выдерживают в течение 1 сут, раствор декантируют с осадка и сушат в течение 1 сут калия гидроксидом. При необходимости сушку повторяют до тех пор, пока калия гидроксид не перестанет расплываться. При положительном результате проверки на отсутствие перекисей, высушенный тетрагидрофуран перегоняют, оставляя в колбе для перегонки не менее 150 мл исходного тетрагидрофурана. Используют фракцию с температурой перегонки 65,5–66,0 °С. Срок годности – 1 мес в защищённом от света месте.

Тетрадекан. [629-59-4]. $C_{14}H_{30}$. (М.м. 198,39).

Тетрадекан.

Содержит не менее 99,5 % $C_{14}H_{30}$.

Бесцветная жидкость.

Практически нерастворим в воде, легко растворим в этаноле и эфире.

d_{20}^{20}. Около 0,76.

n_D^{20}. Около 1,429.

Температура кипения. Около 252 °С.

Температура плавления. Около – 5 °С.

Тетрадеканол. См. **Миристиловый спирт**.

Тетрадециламмония бромид. [14937-42-9]. $C_{40}H_{84}BrN$. (М.м. 659,0).

N,*N*,*N*-Тридецилдекан-1-аминий бромид.

Кристаллический порошок или кристаллы белого цвета или слегка окрашены.

Температура плавления. От 88 до 89 °С.

Тетрадецилтриметиламмония бромид. [8044-71-1]. $C_{17}H_{38}BrN$. (М.м. 336,39).

N,*N*,*N*-Триметилтетрадекан-1-аминий бромид.

Кристаллический порошок белого цвета.

Растворим воде, легко растворим в спирте 96 %.

Температура плавления. Около 240 °С.

Тетразолиевый синий. [1871-22-3]. $C_{40}H_{32}Cl_2N_8O_2$. (М.м. 727,6).

3,3′-(3,3′-Диметокси[1,1'-бифенил]-4,4′-диил)бис(3,5-дифенил-3*H*-1,2λ^5,3,4-тетразол-2-ий) дихлорид.

Кристаллы желтого цвета.

Мало растворим в воде, легко растворим в спирте 96 % и метаноле, практически нерастворим в ацетоне и эфире.

Температура плавления. Около 245 °С с разложением.

Тетраметиламмония гидроксид. [10424-65-4]. $C_4H_{13}NO \cdot 5H_2O$.

(М.м. 181,23).

N,*N*,*N*-Триметилметанаминий гидроксид, пентагидрат.

Квалификация – для ВЭЖХ.

Тетраметиламмония гидроксида раствор 25 %.

Содержит не менее 25,0 % (м/м) $C_4H_{13}NO$. (М.м. 91,15).

Прозрачная, бесцветная или слегка окрашенная жидкость.

Смешивается с водой и спиртом 96 %.

Тетраметиламмония гидроксида раствор 10 %.

Содержит не менее 10,0 % (м/м) $C_4H_{13}NO$. (М.м. 91,15).

Прозрачная, бесцветная или слегка окрашенная жидкость.

Смешивается с водой и спиртом 96 %.

Тетраметиламмония гидроксида раствор разведённый.

10 мл 10 % раствора тетраметиламмония гидроксида доводят спиртом 96 %, свободным от альдегидов, до объёма 100 мл.

Готовят непосредственно перед использованием.

Тетраметиламмония гидросульфат. [80526-82-5]. $C_4H_{13}NO_4S$.

(М.м. 171,22).

N,*N*,*N*-Триметилметанаминий гидросульфат.

Гигроскопичный порошок.

Температура плавления. Около 295 °С.

Тетраметиламмония хлорид. [75-57-0]. $C_4H_{12}ClN$. (М.м. 109,60).

N,*N*,*N*-Триметилметанаминий хлорид.

Бесцветные кристаллы. Растворим в воде и спирте 96 %.

Температура плавления. Около 300 °С с разложением.

Тетраметиламмония хлорида раствор.

10,96 г тетраметиламмония хлорида растворяют в воде в мерной колбе вместимостью 1 л и доводят объём раствора водой до метки. Требуемое значение pH 7,0 устанавливают прибавлением к раствору по каплям 0,1 М раствора натрия гидроксида потенциометрически.

Тетраметилдиаминодифенилметан. [101-61-1]. $C_{17}H_{22}N_2$. (М.м. 254,37).

4,4′-Метиленбис(*N*,*N*-диметиланилин).

Кристаллы от белого до голубовато-белого цвета или листочки.

Практически нерастворим в воде, мало растворим в спирте 96 %, растворим в неорганических кислотах, легко растворим в эфире.

Температура плавления. Около 90 °С.

Тетраметилдиаминодифенилметана реактив.

Раствор А. 2,5 г тетраметилдиаминодифенилметана растворяют в 10 мл уксусной кислоты ледяной и прибавляют 50 мл воды.

Раствор Б. 5,0 г калия йодида растворяют в 100 мл воды.

Раствор В. 0,30 г нингидрина растворяют в 10 мл уксусной кислоты ледяной и прибавляют 90 мл воды.

Растворы А и Б смешивают, к полученному раствору прибавляют 1,5 мл раствора В.

Тетраметилсилан. [75-76-3]. $C_4H_{12}Si$. (М.м. 88,22).

Тетраметилсилан.

Прозрачная, бесцветная жидкость.

Очень мало растворим в воде, растворим в ацетоне и спирте 96 %.

d_{20}^{20}. Около 0,64.

n_D^{20}. Около 1,358.

Температура кипения. Около 26 °С.

Тетраметилсилан, используемый в спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР), должен выдерживать следующее дополнительное испытание.

В спектре ЯМР ^{13}C примерно 10 % (о/о) раствора тетраметилсилана в дейтерированном хлороформе интенсивность любого постороннего сигнала, за исключением тех, которые соответствуют вращению боковых связей и хлороформу, не должна превышать интенсивности боковых линий С-13, расположенных на расстоянии 59,1 Гц по обе стороны основного сигнала тетраметилсилана.

Тетраметилэтилендиамин. [110-18-9]. $C_6H_{16}N_2$. (М.м. 116,20).

N,*N*,*N*',*N*'-Тетраметилэтан-1,2-диамин.

Бесцветная жидкость.

Смешивается с водой, спиртом 96 % и эфиром.

d_{20}^{20}. Около 0,78.

n_D^{20}. Около 1,418.

Температура кипения. Около 121 °С.

Тетрапропиламмония хлорид. [5810-42-4]. $C_{12}H_{28}ClN$. (М.м. 221,81).

N,*N*,*N*-Трипропилпропан-1-аминий хлорид.

Белый или почти белый кристаллический порошок, умеренно растворим в воде.

Температура плавления. От 240 до 242 °С.

Тетрахлорвинфос. [22248-79-9]. $C_{10}H_9Cl_4O_4P$. (М.м. 365,96).

(Диметил)[(*Z*)-1-(2,4,5-трихлорфенил)-2-хлорэтен-1-ил]фосфат.

Температура плавления. Около 95 °С.

Тетрахлорметан. См. **Углерода тетрахлорид**.

Тетрахлорэтан. [79-34-5]. $C_2H_2Cl_4$. (М.м. 167,85).

1,1,2,2-Тетрахлорэтан.

Прозрачная, бесцветная жидкость.

Мало растворим в воде, смешивается со спиртом 96 % и эфиром.

d_{20}^{20}. Около 1,59.

n_D^{20}. Около 1,495.

Температурные пределы перегонки. От 145 до 147 °С; должно перегоняться не менее 95 %.

Тетраэтиламмония гидроксида раствор 20 %. [77-98-5]. $C_8H_{21}NO$. (М.м. 147,26).

Раствор 200 г/л; бесцветная жидкость, является сильной щелочью.

d_{20}^{20}. Около 1,01.

n_D^{20}. Около 1,372.

Квалификация – для ВЭЖХ.

Тетраэтиламмония гидросульфат. [16873-13-5]. $C_8H_{21}NO_4S$. (М.м. 227,32).

N,*N*,*N*-Триэтилэтан-1-аминий гидросульфат.

Гигроскопичный порошок.

Температура плавления. Около 245 °С.

Тетраэтиламмония йодид. [68-05-3]. ($C_8H_{20}IN$. (М.м. 257,16).

N,*N*,*N*-Триэтилэтан-1-аминий иодид.

Белые кристаллы.

Температура плавления. Около 320 °С с разложением.

Тетраэтиленпентамин. [112-57-2]. $C_8H_{23}N_5$. (М.м. 189,30).

3,6,9-Триазаундекан-1,11-диамин.

Бесцветная жидкость. Растворим в ацетоне.

n_D^{20}. Около 1,506.

Хранят в сухом и прохладном месте.

Тиазоловый желтый. См. **Титановый желтый**.

Тиамазол. [60-56-0]. $C_4H_6N_2S$. (М.м. 114,17). 1-Метил-1,3-дигидро-2*H*-имидазол-2-тион.

Кристаллический порошок белого или почти белого цвета.

Легко растворим в воде, растворим в спирте 96 % и метиленхлориде, умеренно растворим в эфире.

Температура плавления. Около 145 °С.

2-(2-Тиенил)уксусная кислота. [1918-77-0]. $C_6H_6O_2S$. (М.м. 142,18).

(Тиофен-2-ил)уксусная кислота.

Порошок коричневого цвета.

Температура плавления. Около 65 °С.

Тимин. [65-71-4]. $C_5H_6N_2O_2$. (М.м. 126,11).

5-Метилпиримидин-2,4(1*H*,3*H*)-дион.

Короткие игольчатые кристаллы или пластинки.

Мало растворим в холодной воде, растворим в горячей воде, растворим в разведённых растворах гидроксидов щелочных металлов.

Тимол. [89-83-8]. $C_{10}H_{14}O$. (М.м. 150,22).

5-Метил-2-(пропан-2-ил)фенол.

Бесцветные кристаллы или кристаллический порошок с характерным запахом.

Очень мало растворим в воде, очень легко растворим в спирте 96 % и эфире, легко растворим в эфирных и жирных маслах, умеренно растворим в глицерине, растворим в разведённых растворах гидроксидов щелочных металлов.

Хроматографическая чистота тимола, используемого в газовой хроматографии, должна быть не менее 95,0 %.

Тимола раствор спиртовой 20 %.

20 г тимола растворяют в спирте 96 % и доводят объём раствора этим же спиртом до 100 мл.

Тимоловый синий. [76-61-9]. $C_{27}H_{30}O_5S$. (М.м. 466,6).

3,3-Бис[4-гидрокси-2-метил5-(пропан-2-ил)фенил]-3*H*-2,1λ^6-бензоксатиол-1,1-дион.

Кристаллический порошок от коричневато-зеленого до зеленовато-синего цвета.

Мало растворим в воде, растворим в спирте 96 % и разведённых растворах гидроксидов щелочных металлов.

Тимолового синего раствор 0,1 %.

0,1 г тимолового синего растворяют в смеси 2,15 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида и 20 мл спирта 96 %, доводят объём раствора водой до 100 мл.

Испытание на чувствительность. К 100 мл воды, свободной от углерода диоксида, прибавляют 0,1 мл раствора тимолового синего и 0,2 мл 0,02 М раствора натрия гидроксида; появляется синее окрашивание, которое переходит в желтое при прибавлении не более 0,1 мл 0,02 М раствора хлористоводородной кислоты.

Переход окраски от красной до желтой в интервале pH 1,2 – 2,8 и от оливково-зеленой до синей в интервале pH 8,0 – 9,6.

Тимолового синего раствор 0,04 %.

0,1 г тимолового синего растворяют в 10,75 мл 0,02 М раствора натрия гидроксида и доводят объём раствора водой, свободной от углерода диоксида, до 250 мл.

Изменение окраски см. выше.

Тимолового синего спиртовой раствор 0,1 %.

0,1 г тимолового синего растворяют в 50 мл спирта 96 % при нагревании и после охлаждения доводят объём раствора водой до 100 мл. Изменение окраски см. выше.

Тимолового синего метанольный раствор. 0,3 % раствор в метаноле.

Тимолового синего метанольный раствор 0,2 %. 0,02 г тимолового синего растворяют в 10 мл метанола.

Тимолового синего раствор 1 %. 1 % раствор в диметилформамиде.

Тимоловый синий водорастворимый. [62625-21-2]. $C_{27}H_{29}NaO_5S$.
(М.м. 488,6).

2-{[4-Гидрокси-2-метил-5-(пропан-2-ил)фенил][2-метил-4-оксо-5-(пропан-2-ил)циклогекса-2,5-диен-1-илиден]метил}бензолсульфонат натрия.

Мелкокристаллический порошок коричневого цвета. Растворим в воде.

Переход окраски раствора от красной к желтой в интервале pH 1,2 – 2,8 и от желтой к синей в интервале pH 8,0 – 9,2.

Тимолового синего водорастворимого раствор. 0,04 % раствор.

Переход окраски от красной к желтой в интервале pH 1,2 – 2,8 и от желтой к синей в интервале pH 8,0 – 9,6.

Тимолфталеин. [125-20-2]. $C_{28}H_{30}O_4$. (М.м. 430,5).

3,3-Бис[4-гидрокси-2-метил-5-(пропан-2-ил)фенил]-2-бензофуран-1(3*H*)-он.

Порошок от белого до желтовато-белого цвета.

Практически нерастворим в воде, растворим в спирте 96 % и разведённых растворах гидроксидов щелочных металлов.

Тимолфталеина раствор 0,1 %. Раствор 1 г/л в спирте 96 %.

Испытание на чувствительность. К 100 мл воды, свободной от углерода диоксида, прибавляют 0,2 мл раствора тимолфталеина, раствор бесцветный; при прибавлении не более 0,05 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида должно появиться синее окрашивание раствора.

Переход окраски от бесцветной до синей в интервале pH 9,3 – 10,5.

Тиоацетамид. [62-55-5]. C_2H_5NS. (М.м. 75,13). Этантиоамид.

Кристаллический порошок или бесцветные кристаллы.

Легко растворим в воде и спирте 96 %.

Температура плавления. Около 113 °С.

Тиоацетамида раствор 4 %. Раствор 40 г/л.

Тиоацетамида реактив.

К 0,2 мл 4 % раствора тиоацетамида прибавляют 1 мл смеси 5 мл воды, 15 мл 1 М раствора натрия гидроксида и 20 мл глицерина 85 %, нагревают при температуре 100 °С в течение 20 с.

Готовят непосредственно перед использованием.

Тиобарбитуровая кислота. [504-17-6]. $C_4H_4N_2O_2S$. (М.м. 144,15).

2-Тиоксодигидропиримидин-4,6(1*H*,5*H*)-дион.

Тиогликолевая кислота. [68-11-1]. $C_2H_4O_2S$. (М.м. 92,12).

Сульфанилуксусная кислота.

Бесцветная жидкость.

Смешивается с водой, растворима в спирте 96 %.

Тиодиэтиленгликоль. [111-48-8]. $C_4H_{10}O_2S$. (М.м. 122,19).

2,2'-Сульфандиилди(этан-1-ол).

Бесцветная или жёлтая вязкая жидкость.

Содержит не менее 99% $C_4H_{10}O_2S$.

d_{20}^{20}. Около 1,18.

Температура кипения. Около 165 °С (20 мм. рт. ст.).

Температура плавления. Около -16 °С.

Тиомерсал. [54-64-8]. $C_9H_9HgNaO_2S$. (М.м. 404,8).

2-[(Этилмеркурио)сульфанил]бензоат натрия.

Легкий кристаллический порошок желтовато-белого цвета.

Очень легко растворим в воде, легко растворим в спирте 96 %, практически нерастворим в эфире.

Тиомочевина. [62-56-6]. CH_4N_2S. (М.м. 76,12). Тиомочевина.

Кристаллический порошок или кристаллы белого цвета.

Растворима в воде и спирте 96 %.

Температура плавления. Около 178 °С.

Тирамин. [51-67-2]. $C_8H_{11}NO$. (М.м. 137,18). 4-(2-Аминоэтил)фенол.

Кристаллы.

Мало растворим в воде, растворим в горячем этаноле.

Температура плавления. От 164 до 165 °С.

Тирозин. [60-18-4]. $C_9H_{11}NO_3$. (М.м. 181,19).

(2*S*)-2-Амино-3-(4-гидроксифенил)пропановая кислота.

Кристаллический порошок или кристаллы белого цвета, или бесцветные кристаллы.

Мало растворим в воде, практически нерастворим в ацетоне, этаноле и эфире, растворим в кислоте хлористоводородной разведённой и разведённых растворах гидроксидов щелочных металлов.

Титан. [7440-32-6]. Ti. (А.м. 47,87). Титан.

Содержит не менее 99 % Ti.

Металлический порошок или тонкая проволока, диаметром не более 0,5 мм, или губка.

Температура плавления. Около 1668 °С.

Плотность. Около 4,507 г/см^3.

Титана диоксид. [13463-67-7]. TiO_2. (М.м. 79,87). Оксид титана(IV).

Белый или почти белый порошок.

Практически нерастворим в воде, нерастворим в разведённых минеральных кислотах, но медленно растворяется в горячей серной кислоте концентрированной.

Титана диоксида раствор.

0,1 г титана диоксида нагревают с 100 мл серной кислоты концентрированной на сетке при периодическом перемешивании до полного растворения. Хранят в стеклянном сосуде с притертой пробкой.

Титана(III) хлорид. [7705-07-9]. $TiCl_3$. (М.м. 154,23).

Хлорид титана(III).

Кристаллы красновато-фиолетового цвета, расплывающиеся на воздухе.

Растворим в воде и спирте 96 %, практически нерастворим в эфире.

Температура плавления. Около 440 °С.

Хранят в воздухонепроницаемой упаковке.

Титана(III) хлорида раствор 15 %. Раствор 150 г/л в растворе 100 г/л хлористоводородной кислоты.

d_{20}^{20}. Около 1,19.

Титана(III) хлорид – серной кислоты реактив.

20 мл 15 % раствора титана(III) хлорида осторожно смешивают с 13 мл серной кислоты концентрированной, прибавляют достаточное количество раствора водорода пероксида концентрированного до получения желтого окрашивания, нагревают до начала выделения белых паров и охлаждают. Разводят водой, повторяют выпаривание и прибавление воды до получения бесцветного раствора, доводят объём раствора водой до 100 мл.

Титановый желтый. [1829-00-1]. $C_{28}H_{19}N_5Na_2O_6S_4$. (М.м. 695,7).

2,2′-[(Триаз-1-ен-1,3-диил)бис-4,1-фенилен]бис(6-метил-1,3-бензотиазол-7-сульфонат)] динатрия.

Порошок желтовато-коричневого цвета.

Легко растворим в воде и спирте 96 %.

Титанового желтого бумага.

Полоски фильтровальной бумаги погружают в раствор титанового желтого, выдерживают несколько минут и сушат при комнатной температуре.

Титанового желтого раствор 0,05 %. Раствор 0,5 г/л.

Испытание на чувствительность. К 10 мл воды прибавляют 0,1 мл раствора титанового желтого, 0,2 мл эталонного раствора магния (10 ppm Mg) и 1,0 мл 1 М раствора натрия гидроксида. Полученный раствор сравнивают с эталонным раствором, приготовленным таким же образом, за исключением магния; должно наблюдаться отчетливое розовое окрашивание.

Тозиларгинина метилового эфира гидрохлорид. [1784-03-8].

$C_{14}H_{22}N_4O_4S \cdot HCl$. (М.м. 378,87).

Метил[(2*S*)-5-Карбамимидамидо-2-(4-метилбензолсульфонамидо)пентаноата] гидрохлорид.

$[\alpha]_D^{20}$. От – 12° до – 16° (4 % раствор).

Температура плавления. Около 145 °С.

Тозиларгинина метилового эфира гидрохлорида раствор.

К 98,5 мг тозиларгинина метилового эфира гидрохлорида прибавляют 5 мл буферного раствора трис(гидроксиметил)аминометана с pH 8,1, встряхивают до растворения, прибавляют 2,5 мл смешанного раствора метилового красного и доводят объём раствора водой до 25 мл.

Тозил-лизил-хлорметана гидрохлорид. [4238-41-9]. $C_{14}H_{21}ClN_2O_3S \cdot HCl$. (М.м. 369,31).

N-[(3*S*)-7-Амино-2-оксо-1-хлоргептан-3-ил]-4-метилбензолсульфонамида гидрохлорид.

$[\alpha]_D^{20}$. От –7 до –9° (2 % раствор).

Температура плавления. Около 155 °С с разложением.

$A_{1см}^{1\%}$. От 310 до 340. Определение проводят при длине волны 230 нм, используя в качестве раствора сравнения воду.

Тозил-фенилаланил-хлорметан. [402-71-1]. $C_{17}H_{18}ClNO_3S$. (М.м. 351,85).

4-Метил-*N*-[(2*S*)-3-оксо-4-хлор-1-фенилбутан-2-ил]бензолсульфонамид.

$[\alpha]_D^{20}$. От – 85° до – 89° (1 % раствор в спирте 96 %).

Температура плавления. Около 105 °С.

$A_{1см}^{1\%}$. От 290 до 320. Определение проводят при длине волны 228,5 нм в спирте 96 %.

***о*-Толидин**. [119-93-7]. $C_{14}H_{16}N_2$. (М.м. 212,29).

3,3'-Диметил[1,1'-бифенил]-4,4'-диамин.

Содержит не менее 97,0 % $C_{14}H_{16}N_2$.

Кристаллический порошок светло-коричневого цвета.

Температура плавления. Около 130 °С.

Ядовит.

***о*-Толидина раствор**.

0,16 г *о*-толидина растворяют в 30,0 мл уксусной кислоты ледяной, прибавляют 1,0 г калия йодида и доводят объём раствора водой до 500,0 мл.

***о*-Толуидин**. [95-53-4]. C_7H_9N. (М.м. 107,15). 2-Метиланилин.

Жидкость светло-желтого цвета, под действием воздуха и света становится красновато-коричневой.

Мало растворим в воде, растворим в спирте 96 % и в растворах неорганических кислот.

d_{20}^{20}. Около 1,01.

n_D^{20}. Около 1,569.

Температура кипения. Около 200 °С.

Хранят в воздухонепроницаемой упаковке, в защищенном от света месте.

***п*-Толуидин**. [106-49-0]. C_7H_9N. (М.м. 107,15). 4-Метиланилин.

Блестящие пластинки или хлопья.

Мало растворим в воде, легко растворим в ацетоне и спирте 96 %, растворим в эфире.

Температура плавления. Около 44 °С.

***о*-Толуидина гидрохлорид**. [636-21-5]. $C_7H_9N \cdot HCl$. (М.м. 143,61).

2-Метиланилина гидрохлорид.

Содержит не менее 98,0 % $C_7H_{10}ClN$.

Кристаллический порошок.

Температура плавления. От 215 до 217 °С.

Толуидиновый синий. [92-31-9]. $C_{15}H_{16}ClN_3S$. (М.м. 305,83).

3-Амино-7-(диметиламино)-2-метил-5λ^4-фенотиазин-5-ий хлорид..

Порошок тёмно-зеленого цвета.

Растворим в воде, мало растворим в спирте 96 %.

Толуиленовый красный. См. **Нейтральный красный**.

Толуол. [108-88-3]. C_7H_8. (М.м. 92,14). Толуол.

Прозрачная, бесцветная, воспламеняющаяся жидкость.

Очень мало растворим в воде, смешивается со спиртом 96 %.

d_{20}^{20}. От 0,865 до 0,870.

Температура кипения. Около 110 °С.

Толуол, свободный от серы.

Должен выдерживать требования для толуола и следующее дополнительное испытание.

Серосодержащие соединения. К 10 мл толуола прибавляют 1 мл этанола, 3 мл раствора калия плюмбита и кипятят с обратным холодильником в течение 15 мин. Через 5 мин водный слой не должен потемнеть.

Вещества, родственные тиофену. 2 мл толуола встряхивают с 5 мл реактива изатина в течение 5 мин и оставляют на 15 мин; в нижнем слое не должно наблюдаться синее окрашивание.

***о*-Толуолсульфонамид**. [88-19-7]. $C_7H_9NO_2S$. (М.м. 171,22).

2-Метилбензолсульфонамид.

Кристаллический порошок белого цвета.

Мало растворим в воде и эфире, растворим в спирте 96 % и растворах гидроксидов щелочных металлов.

Температура плавления. Около 156 °С.

Толуолсульфонамид. [70-55-3]. $C_7H_9NO_2S$. (М.м. 171,22).

4-Метилбензолсульфонамид.

Кристаллический порошок белого цвета.

Мало растворим в воде и эфире, растворим в спирте 96 % и растворах гидроксидов щелочных металлов.

Температура плавления. Около 136 °С.

Толуолсульфоновая кислота. [6192-52-5]. $C_7H_8O_3S \cdot H_2O$. (М.м. 190,22).

4-Метилбензолсульфоновая кислота, моногидрат.

Содержит не менее 87,0 % $C_7H_8O_3S$.

Кристаллический порошок или кристаллы белого цвета.

Легко растворима в воде, растворима в спирте 96 % и эфире.

Торин. См. **Нафтарзон**.

Тория(IV) нитрат. [13823-29-5]. $Th(NO_3)_4 \cdot xH_2O$. (М.м. 480,1 для безводного).

Нитрат тория(IV), гидрат.

Белые кристаллы, слегка расплывающиеся на воздухе.

Легко растворим в воде и спирте 96 %.

Трагакант. [9000-65-1].

Затвердевшая на воздухе смола *Astragalus gummifer* Labill. и некоторых других видов *Astragalus* из западной Азии.

Триамцинолон. [124-94-7]. $C_{21}H_{27}FO_6$. (М.м. 394,43).

11β,16α,17α,21-Тетрагидрокси-9α-фторпрегна-1,4-диен-3,20-дион.

Белый или почти белый кристаллический порошок.

Практически нерастворим в воде и метиленхлориде, мало растворим в метаноле.

Температура плавления. От 262 до 263 °С.

Триацетин. [102-76-1]. $C_9H_{14}O_6$. (М.м. 218,20).

(Пропан-1,2,3-триил)триацетат.

Почти прозрачная, бесцветная или желтоватого цвета жидкость.

Растворим в воде, смешивается со спиртом 96 % и эфиром.

d_{20}^{20}. Около 1,16.

n_D^{20}. Около 1,43.

Температура кипения. Около 260 °С.

Трикалия фосфат тригидрат. [22763-03-7]. $K_3PO_4 \cdot 3H_2O$. (М.м. 266,31).

Трикалия фосфат тригидрат.

Белый или почти белый кристаллический порошок, легко растворим в воде.

Трикозан. [638-67-5]. $C_{23}H_{48}$. (М.м. 324,63).

Трикозан.

Кристаллы белого цвета.

Практически нерастворим в воде, растворим в эфире и гексане.

n_D^{20}. Около 1,447.

Температура плавления. Около 48 °C.

Трилон Б. См. **Натрия эдетат**.

Триметилпентан. [540-84-1]. C_8H_{18}. (М.м. 114,23). 2,2,4-Триметилпентан.

Бесцветная, воспламеняющаяся жидкость.

Практически нерастворим в воде, растворим в этаноле.

d_{20}^{20}. От 0,691 до 0,696.

n_D^{20}. От 1,391 до 1,393.

Температурные пределы перегонки. От 98 до 100 °C; должно перегоняться не менее 95 %.

Триметилпентан, используемый в спектрофотометрии, должен выдерживать следующие дополнительные испытания.

Минимальное пропускание. 98 % в области длин волн от 250 до 420 нм; в качестве раствора сравнения используют воду.

Оптическая плотность. Не более 0,07 в области длин волн от 220 до 360 нм; в качестве раствора сравнения используют воду.

***N*-Триметилсилилимидазол**. [18156-74-6]. $C_6H_{12}N_2Si$. (М.м. 140,26).

1-(Триметилсилил)-1*H*-имидазол.

Бесцветная, гигроскопичная жидкость.

d_{20}^{20}. Около 0,96.

n_D^{20}. Около 1,48.

Хранят в воздухонепроницаемой упаковке.

***N*,*O*-бис(Триметилсилил)ацетамид**. [10416-59-8]. $C_8H_{21}NOSi_2$.

(М.м. 203,43). (Триметилсилил)[*N*-(триметилсилил)этанимидоат].

Бесцветная жидкость.

d_{20}^{20}. Около 0,83.

***N*,*O*-бис(Триметилсилил)трифторацетамид**. [25561-30-2]. $C_8H_{18}F_3NOSi_2$.

(М.м. 257,40).

(Триметилсилил)[*N*-(триметилсилил)-2,2,2-трифторэтанимидоат].

Бесцветная жидкость.

d_{20}^{20}. Около 0,97.

n_D^{20}. Около 1,38.

Температура кипения. Около 40 °С при 12 мм рт. ст.

Триптофан. [73-22-3]. $C_{11}H_{12}N_2O_2$. (М.м. 204,23). L-Триптофан

(2*S*)-2-Амино-3-(1*H*-индол-3-ил)пропановая кислота.

Кристаллический порошок от белого до желтовато-белого цвета или бесцветные кристаллы.

Мало растворим в воде, очень мало растворим в спирте 96 %, практически нерастворим в эфире.

$[\alpha]_D^{20}$. Около – 30° (1 % раствор).

1,3,5-Трис[3,5-ди(1,1-диметилэтил)-4-гидроксибензил]-1,3.5-триазин-2,4,6(1*H*,3*H*,5*H*)-трион. [27676-62-6]. $C_{48}H_{69}N_3O_6$. (М.м. 784,1).

1,3,5-Трис{[3,5-ди(*трет*-бутил)-4-гидроксифенил]метил}-1,3,5-триазаин-2,4,6(1*H*,3*H*,5*H*)-трион.

Кристаллический порошок белого цвета.

Температура плавления. От 218 до 222 °С.

Трис[2,4-ди(1,1-диметилэтил)фенил]фосфит. [31570-04-4]. $C_{42}H_{63}O_3P$. (М.м. 646,9).

Трис[3,5-ди(*трет*-бутил)фенил]фосфит.

Порошок белого цвета.

Температура плавления. От 182 до 186 °С.

Трис(гидроксиметил)аминометан. [77-86-1]. $C_4H_{11}NO_3$. (М.м. 121,14).

2-Амино-2-(гидроксиметил)пропан-1,3-диол.

Белый кристаллический порошок или бесцветные кристаллы.

Очень легко растворим в воде, умеренно растворим в спирте 96 %.

Температура плавления. От 168 до 174 °С.

Трис(гидроксиметил)аминометана раствор.

Раствор трис(гидроксиметил)аминометана содержит эквивалент 24,22 г $C_4H_{11}NO_3$ в 1000,0 мл.

Трисцианоэтоксипропан. [2465-93-2]. $C_{12}H_{17}N_3O_3$. (М.м. 251,28).

3,3',3"-[Пропан-1,2,3-триилтрис(окси)]трипропаннитрил.

Вязкая жидкость коричнево-желтого цвета.

Растворим в метаноле.

Используют в качестве неподвижной фазы в газовой хроматографии.

d_{20}^{20}. Около 1,11.

Вязкость. Около 172 мПа·с.

Тритон Х-100. [9002-93-1]. $C_{14}H_{22}O(C_2H_4O)_n$, n = 9 – 10. (М.м. около 625).

α-Гидро-ω-[4-(1,1,3,3-тетраметилбутил)фенил]поли(оксиэтилен).

При комнатной температуре прозрачное, очень вязкое вещество.

Смешивается с водой.

Плотность. 1,07 г/см^3

Температура плавления. 6 °С.

Температура кипения. 200 °С.

Вязкость. 0,24 Па·с при температуре 25 °С.

При комнатной температуре прозрачное, очень вязкое вещество.

Смешивается с водой.

Трифенилметанол. [76-84-6]. $C_{19}H_{16}O$. (М.м. 260,33).

Трифенилметанол.

Бесцветные кристаллы.

Практически нерастворим в воде, легко растворим в спирте 96 %.

Трифенилтетразолия хлорид. [298-96-4]. $C_{19}H_{15}ClN_4$. (М.м. 334,80).

2,3,5-Трифенил-3*H*-1,2λ^5,3,4-тетразол-2-ий хлорид.

Содержит не менее 98,0 % $C_{19}H_{15}ClN_4$.

Порошок светло-желтого или серовато-желтого цвета.

Растворим в воде, ацетоне и спирте 96 %, практически нерастворим в эфире.

Температура плавления. Около 240 °С с разложением.

Хранят в защищенном от света месте.

Трифенилтетразолия хлорида раствор 0,5 %. Раствор 5 г/л в спирте 96 %, свободном от альдегидов.

Хранят в защищенном от света месте.

Трифенилфосфат. [115-86-6]. $C_{18}H_{15}PO_4$. (М.м. 326,28). Трифенилфосфат.

Бесцветные кристаллы или белый кристаллический порошок без запаха.

Растворим в органических растворителях, практически нерастворим в воде.

Температура плавления. 49 – 51 °С.

Трифторуксусная кислота. [76-05-1]. $C_2HF_3O_2$. (М.м. 114,02).

Трифторуксусная кислота.

Содержит не менее 99 % $C_2HF_3O_2$.

Жидкость.

Смешивается с ацетоном, спиртом 96 % и эфиром.

d_{20}^{20}. Около 1,53.

Температура кипения. Около 72 °С.

Используют квалификацию, пригодную для секвентации протеинов.

Хранят в воздухонепроницаемой упаковке.

Трифторуксусной кислоты раствор 10 %.

10 г трифторуксусной кислоты растворяют в воде и доводят объём раствора водой до 100 мл.

Трифторуксусный ангидрид. [407-25-0]. $C_4F_6O_3$. (М.м. 210,03).

Трифторуксусный ангидрид.

Бесцветная жидкость.

d_{20}^{20}. Около 1,51.

Температура кипения. 39,1 °С.

Трихлортрифторэтан. [76-13-1]. $C_2Cl_3F_3$. (М.м. 187,38).

1,1,2-Трифтор-1,2,2-трихлорэтан.

Бесцветная, летучая жидкость.

Практически нерастворим в воде, смешивается с ацетоном и эфиром.

d_{20}^{20}. Около 1,58.

Температурные пределы перегонки. От 47 до 48 °С; должно перегоняться не менее 98 %.

Трихлоруксусная кислота. [76-03-9]. $C_2HCl_3O_2$. (М.м. 163,39).

Трихлоруксусная кислота.

Бесцветные кристаллы или кристаллическая масса.

Очень легко расплывается на воздухе, очень легко растворима в воде и спирте 96 %.

Хранят в воздухонепроницаемой упаковке.

Трихлоруксусной кислоты раствор 5 %.

50,0 г трихлоруксусной кислоты помещают в мерную колбу вместимостью 1 л, растворяют в воде и доводят объём раствора водой до метки.

Трихлоруксусной кислоты раствор 4 %.

40,0 г трихлоруксусной кислоты помещают в мерную колбу вместимостью 1 л, растворяют в воде и доводят объём раствора водой до метки.

1,1,1-Трихлорэтан. [71-55-6]. $C_2H_3Cl_3$. (М.м. 133,40). 1,1,1-Трихлорэтан.

Не воспламеняющаяся жидкость.

Практически нерастворим в воде, растворим в ацетоне, эфире и метаноле.

d_{20}^{20}. Около 1,34.

n_D^{20}. Около 1,438.

Температура кипения. Около 74 °С.

2,2,2-Трихлорэтанол. [115-20-8]. $C_2H_3Cl_3O$. (М.м. 149,40).

2,2,2-Трихлорэтан-1-ол.

d_{20}^{20}. Около 1,56.

n_D^{20}. Около 1,49.

Температура кипения. Около 152 °С.

Температура плавления. Около 17 °С.

Трихлорэтилен. [79-01-6]. C_2HCl_3. (М.м. 131,39).

1,1,2-Трихлорэтен.

Бесцветная жидкость.

Практически нерастворим в воде, смешивается о спиртом 96 % и эфиром.

d_{20}^{20}. Около 1,46.

n_D^{20}. Около 1,477.

Триэтаноламин. [102-71-6]. $C_6H_{15}NO_3$. (М.м. 149,19).

2,2',2"-Нитрилотри(этан-1-ол).

Бесцветная, вязкая, очень гигроскопичная жидкость, под действием воздуха и света приобретает коричневую окраску.

Смешивается с водой, ацетоном, спиртом 96 %, глицерином 85 % и метанолом.

d_{20}^{20}. Около 1,13.

Хранят в воздухонепроницаемой упаковке, в защищенном от света месте.

Триэтиламин. [121-44-8]. $C_6H_{15}N$. (М.м. 101,19).

N,N-Диэтилэтан-1-амин.

Бесцветная жидкость.

Мало растворим в воде при температуре ниже 18,7 °С, смешивается со спиртом 96 % и эфиром.

d_{20}^{20}. Около 0,727.

n_D^{20}. Около 1,401.

Температура кипения. Около 90 °С.

Триэтилендиамин. [280-57-9]. $C_6H_{12}N_2$. (М.м. 112,17).

1,4-Диазабицикло[2.2.2]октан.

Кристаллы, очень гигроскопичны. Легко сублимируется при комнатной температуре.

Легко растворяется в воде, ацетоне и этаноле.

Температура кипения. Около 174 °С.

Температура плавления. Около 158 °С.

Хранят в воздухонепроницаемой упаковке.

Трометамол. См. **Трис(гидроксиметил) аминометан**.

Тропеолин 00. [554-73-4]. $C_{18}H_{14}N_3NaO_3S$. (М.м. 375,38).

4-[(4-Анилинофенил)диазенил]бензолсульфонат натрия.

Оранжево-желтый порошок или золотисто-желтые игольчатые кристаллы. Растворим в горячей воде и спирте 96 %.

Переход окраски раствора от красной к желтой в интервале pH 1,4 – 3,2.

Тропеолин 00 раствор 0,1 %.

0,1 г тропеолина 00 смешивают с 100 мл воды. Растворение проводят при нагревании до температуры 100 °С.

Тропеолин 00 раствор 0,2 %.

0,2 г тропеолина 00 смешивают с 100 мл метанола, периодически встряхивают в течение 1 ч и фильтруют.

Тропеолин 000-1. [523-44-4]. $C_{16}H_{11}N_2NaO_4S$. (М.м. 350,32).

4-[(4-Гидроксинафталин-1-ил)диазенил]бензолсульфонат натрия.

Порошок темно-красного или красновато-коричневого цвета.

Тропеолин 000-2. [633-96-5]. $C_{16}H_{11}N_2NaO_4S$. (М.м. 350,32).

4-[(2-Гидроксинафталин-1-ил)диазенил]бензолсульфонат натрия.

Тропеолин 000-2 раствор 0,1 %.

0,1 г тропеолина 000-2 растворяют в 80 мл воды и доводят объём раствора до 100 мл спиртом 96 %.

Раствор пригоден для использования в течение 3 месяцев.

ТСХ пластинка со слоем силикагеля.

Подложка из стекла, металла или пластика, покрытая слоем силикагеля с подходящей толщиной и размером частиц (обычно от 2 до 10 мкм для пластин с мелким размером частиц для ВЭТСХ и от 5 до 40 мкм для обычных ТСХ пластин). Если необходимо, размер частиц указывают после названия сорбента в испытаниях, в которых он используется.

Сорбент может содержать связующее органическое вещество.

Хроматографическая разделяющая способность. На пластинку наносят необходимый объём раствора для определения пригодности ТСХ пластинок (10 мкл для обычной пластинки и от 1 до 2 мкл для пластинки с мелким размером частиц). Хроматографируют в системе растворителей метанол – толуол 20:80. Когда фронт растворителей пройдет две трети длины

пластинки, она считается пригодной, если на ней видны 4 четко разделенных пятна:

- пятно бромкрезолового зеленого с R_f не более 0,15;
- пятно метилового оранжевого с R_f в пределах от 0,1 до 0,25;
- пятно метилового красного с R_f в пределах от 0,35 до 0,55;
- пятно судана красного G с R_f в пределах от 0,75 до 0,98.

Раствор для определения пригодности ТСХ пластинок.

Смешивают по 1,0 мл 0,05 % раствора судана красного G в толуоле, свежеприготовленного 0,05 % раствора метилового оранжевого в этаноле, 0,05 % раствора бромкрезолового зеленого в ацетоне, 0,025 % раствора метилового красного в ацетоне и доводят объём полученного раствора ацетоном до 10,0 мл.

ТСХ пластинка со слоем силикагеля, импрегнированная 10 % раствором натрия хлорида.

ТСХ пластинку со слоем силикагеля помещают в камеру с 10 % раствором натрия хлорида и хроматографируют восходящим методом. Когда фронт подвижной фазы дойдёт до конца пластинки, её вынимают из камеры и подсушивают на воздухе в течение 1 ч, сушат в сушильном шкафу при температуре 120 °С в течение 10 мин и охлаждают на воздухе.

ТСХ пластинка со слоем силикагеля F_{254}.

Должна выдерживать требования для ТСХ пластинки со слоем силикагеля со следующими изменениями.

Содержит флуоресцентный индикатор с максимумом поглощения при длине волны 254 нм.

Гашение флуоресценции. На пластинку наносят в 5 точек последовательно возрастающие объёмы от 1 до 10 мкл для обычной ТСХ пластинки и от 0,2 до 2 мкл для ВЭТСХ пластинки 0,1 % раствора бензойной кислоты в смеси растворителей этанол – циклогексан 15:85. Хроматографируют в той же смеси растворителей. Когда фронт растворителя пройдет половину длины пластинки, ее вынимают из камеры и сушат до испарения растворителей.

Пластинку просматривают в УФ-свете при длине волны 254 нм. На обычных ТСХ пластинках бензойная кислота должна обнаруживаться в виде темных пятен на флуоресцирующем фоне примерно на середине хроматограммы для нанесенных количеств 2 мкг и более. На ВЭТСХ пластинках бензойная кислота должна обнаруживаться в виде темных пятен на флуоресцирующем фоне примерно на середине хроматограммы для нанесенных количеств 0,2 мкг и более.

ТСХ пластинка со слоем силикагеля G.

Должна выдерживать требования для ТСХ пластинки со слоем силикагеля со следующим изменением.

Содержит кальция сульфат полугидрат (гипс) в качестве связующего вещества.

ТСХ пластинка со слоем силикагеля GF_{254}.

Должна выдерживать требования для ТСХ пластинки со слоем силикагеля со следующим изменением.

Содержит кальция сульфат полугидрат (гипс) в качестве связующего вещества и флуоресцентный индикатор с максимумом поглощения при длине волны 254 нм.

Гашение флуоресценции. Должна выдерживать требования для ТСХ пластинки со слоем силикагеля F_{254}.

ТСХ пластинка со слоем силикагеля октадецилсилильного F_{254}.

Подложка из стекла, металла или пластика, покрытая слоем силикагеля химически модифицированного октадецилсилильными группами с подходящей толщиной и размером частиц (обычно от 2 до 10 мкм для пластин ВЭТСХ и от 5 до 40 мкм для обычных ТСХ пластин). Если необходимо, размер частиц указывают после названия сорбента в испытаниях, в которых он используется.

Сорбент может содержать связующее органическое вещество.

Содержит флуоресцентный индикатор с максимумом поглощения при длине волны 254 нм.

Гашение флуоресценции. Должна выдерживать требования для ТСХ пластинки со слоем силикагеля F_{254}.

ТСХ пластинка со слоем силикагеля октилсилильного. Подложка из стекла, металла или пластика, покрытая слоем силикагеля химически модифицированного октилсилильными группами с подходящей толщиной и размером частиц (обычно от 2 до 10 мкм для пластин ВЭТСХ и от 5 до 40 мкм для обычных ТСХ пластин). Если необходимо, размер частиц указывают после названия сорбента в испытаниях, в которых он используется.

Сорбент может содержать связующее органическое вещество.

ТСХ пластинка со слоем силикагеля силанизированного.

Подложка из стекла, металла или пластика, покрытая слоем силикагеля силанизированного с подходящей толщиной и размером частиц (обычно от 2 до 10 мкм для пластин ВЭТСХ и от 5 до 40 мкм для обычных ТСХ пластин). Если необходимо, размер частиц указывают после названия сорбента в испытаниях, где он используется.

Сорбент может содержать связующее органическое вещество.

Хроматографическая разделяющая способность. По 0,1 г метиллаурата, метилмиристата, метилпальмитата и метилстеарата помещают в коническую колбу вместимостью 250 мл, прибавляют 40 мл 3 % спиртового раствора калия гидроксида и нагревают с обратным холодильником при температуре 100 °С в течение 1 ч. Охлаждают, раствор помещают в делительную воронку с помощью 100 мл воды, подкисляют хлористоводородной кислотой разведённой 7,3 % до pH 2 – 3 и встряхивают с 3 порциями, по 10 мл каждая, метиленхлорида. Объединенные метиленхлоридные извлечения сушат над натрия сульфатом безводным, фильтруют и выпаривают на водяной бане досуха. Сухой остаток растворяют в 50 мл метиленхлорида (испытуемый раствор). Определение проводят методом ТСХ, используя ТСХ пластинку со слоем силикагеля силанизированного. На пластинку наносят в 3 точки необходимый объём испытуемого раствора (около 10 мкл для обычной ТСХ

пластинки и от 1 до 2 мкл для ВЭТСХ пластинки с мелким размером частиц). Хроматографируют в системе растворителей уксусная кислота ледяная – вода – диоксан 10:25:65. Когда фронт растворителей пройдет две трети длины пластинки, ее вынимают из камеры и сушат при температуре 120 °С в течение 30 мин. Пластинку охлаждают, опрыскивают 3,5 % раствором фосфорномолибденовой кислоты в 2-пропаноле и нагревают при температуре 150 °С до появления пятен. Затем пластинку обрабатывают парами аммиака до получения фона белого цвета. Пластинка считается пригодной, если на ней видны 4 четко разделенных пятна.

ТСХ пластинка со слоем силикагеля силанизированного F_{254}.

Должна выдерживать требования для ТСХ пластинки со слоем силикагеля силанизированного со следующим изменением.

Содержит флуоресцентный индикатор с максимумом поглощения при длине волны 254 нм.

ТСХ пластинка со слоем силикагеля этилсилильного F_{254}. Подложка из стекла, металла или пластика, покрытая слоем силикагеля химически модифицированного этилсилильными группами с подходящей толщиной и размером частиц (обычно от 2 до 10 мкм для пластин ВЭТСХ и от 5 до 40 мкм для обычных ТСХ пластин). Если необходимо, размер частиц указывают после названия сорбента в испытаниях, в которых он используется.

Сорбент может содержать связующее органическое вещество.

Содержит флуоресцентный индикатор с максимумом поглощения при длине волны 254 нм.

Гашение флуоресценции. Должна выдерживать требования для ТСХ пластинки со слоем силикагеля F_{254}.

ТСХ пластинка со слоем целлюлозы.

Подложка из стекла, металла или пластика, покрытая слоем целлюлозы с подходящей толщиной.

Туйон. [546-80-5]. $C_{10}H_{16}O$. (М.м. 152,23).

(1*S*,4*R*,5*R*)-4-Метил-1-(пропан-2-ил)бицикло[3.1.0]гексан-3-он.

Бесцветная или почти бесцветная жидкость.

Практически нерастворим в воде, растворим в спирте 96 % и других органических растворителях.

d_{20}^{20}. Около 0,925.

n_D^{20}. Около 1,455.

$[\alpha]_D^{20}$. Около – 15°.

Температура кипения. Около 86 °С.

Углеводороды с низким давлением паров (тип L).

Маслянистая масса.

Растворимы в бензоле и толуоле.

Углерод графитированный для хроматографии. [7440-44-0].

Углеродные цепочки с длиной цепи более C_9; размер частиц от 400 до 850 мкм.

Плотность. 0,72.

Удельная площадь поверхности. 10 $м^2/г$.

Не применяют при температуре выше 400 °С.

Углерода диоксид. [124-38-9]. CO_2. (М.м. 44,01).

Оксид углерода(IV).

Бесцветный газ. При давлении 101 кПа 1 объём газа растворяется в 1 объёме воды.

Углерода диоксид (1).

Содержит не менее 99,995 % (о/о) CO_2.

Углерода монооксид. Менее 5 ppm.

Кислород. Менее 25 ppm.

Углерода дисульфид. [75-15-0]. CS_2. (М.м. 76,14). Дисульфид углерода.

Бесцветная или желтоватого цвета воспламеняющаяся жидкость.

Практически нерастворим в воде, смешивается с этанолом и эфиром.

d_{20}^{20}. Около 1,26.

Температура кипения. От 46 до 47 °С.

Углерода монооксид. [630-08-0]. CO. (М.м. 28,01). Оксид углерода(II).

Содержит не менее 99,97 % (о/о) CO.

Углерода тетрахлорид. См. **Черырёххлористый углерод**.

Уголь активированный.

Черный порошок без запаха.

Практически нерастворим в воде и органических растворителях.

Уголь животного или растительного происхождения, специально обработанный и обладающий в связи с этим большой поверхностной активностью, способный адсорбировать газы, токсины, тяжелые металлы и др.

Хранят в плотно закрытых упаковках, отдельно от веществ, выделяющих в атмосферу газы или пары.

Уксусный ангидрид. [108-24-7]. $C_4H_6O_3$. (М.м. 102,09). Уксусный ангидрид.

Бесцветная прозрачная жидкость с резким запахом. При растворении реактива в воде образуется уксусная кислота, причем реакция сначала идет медленно, а затем ускоряется и проходит бурно (возможны выбросы).

Обращаться с осторожностью.

Температура кипения. От 136 до 142 °С.

Уксусного ангидрида раствор 25 % (о/о) в безводном пиридине.

25,0 мл уксусного ангидрида растворяют в безводном пиридине, объём раствора доводят тем же растворителем до 100,0 мл.

Хранят, защищая от света и воздуха.

Уксусного ангидрида раствор 12 % (о/о) в безводном пиридине.

12 мл уксусного ангидрида смешивают с 88 мл безводного пиридина.

Хранят в банках оранжевого стекла с притертыми пробками.

Уксусного ангидрида раствор в серной кислоте.

Осторожно смешивают 5 мл уксусного ангидрида и 5 мл серной кислоты концентрированной. Полученную смесь прибавляют при охлаждении по каплям к 50 мл этанола безводного.

Готовят непосредственно перед использованием.

Уксусная кислота. [64-19-7]. $C_2H_4O_2$. (М.м. 60,05).

Уксусная кислота.

Содержание $C_2H_4O_2$ не менее 98 %.

Бесцветная прозрачная жидкость с резким специфическим запахом.

Уксусная кислота безводная.

Содержит не менее 99,6 % (м/м) $C_2H_4O_2$.

Бесцветная жидкость или белые блестящие папоротникообразные кристаллы. Легко смешивается или легко растворяется в воде, спирте 96 %, эфире, глицерине 85 % и большинстве жирных и эфирных масел.

d_{20}^{20}. От 1,052 до 1,053.

Температура кипения. От 117 до 119 °С.

Температура замерзания. Не ниже 15,8 °С.

Вода. Не более 0,4 %. Если содержание воды превышает 0,4 %, прибавляют рассчитанное количество уксусного ангидрида.

Хранят в защищенном от света месте.

Уксусная кислота ледяная.

Содержит не менее 98,8 % (м/м) $C_2H_4O_2$.

d_{20}^{20}. От 1,049 до 1,051.

Температура кипения. От 117 до 119 °С.

Уксусная кислота разведённая 30 %.

Содержит не менее 290 г/л и не более 310 г/л $C_2H_4O_2$ (М.м. 60,05).

30 г уксусной кислоты ледяной доводят водой до 100,0 мл.

Уксусная кислота разведённая 30 % в спирте 60 %.

Содержит не менее 290 г/л и не более 310 г/л $C_2H_4O_2$ (М.м. 60,05).

30 г уксусной кислоты ледяной доводят спиртом 60 % до 100,0 мл.

Уксусная кислота разведённая 15 %.

15,3 г уксусной кислоты ледяной доводят водой до 100,0 мл.

Уксусная кислота разведённая 12 %.

Содержит не менее 115 г/л и не более 125 г/л $C_2H_4O_2$ (М.м. 60,05).

12,24 г уксусной кислоты ледяной доводят водой до 100,0 мл.

Уксусной кислоты раствор 3 %.

3,1 г уксусной кислоты ледяной доводят водой до 100,0 мл.

Уксусной кислоты раствор 1 %.

1,0 г уксусной кислоты ледяной доводят водой до 100,0 мл.

Уксусной кислоты раствор 5 М.

286 мл уксусной кислоты ледяной осторожно смешивают с водой и доводят водой до 1000,0 мл.

Уксусной кислоты раствор 2 М.

114 мл уксусной кислоты ледяной доводят водой до 1000,0 мл.

Уксусной кислоты раствор 1 М.

57 мл уксусной кислоты ледяной доводят водой до 1000,0 мл.

Универсальный индикатор.

Состав: 0,006 г бромкрезолового пурпурового, 0,01 г бромкрезолового зеленого, 0,02 г метилового оранжевого, 0,04 г тропеолина 00, 0,04 г фенолфталеина, 0,05 г тимолового синего, 0,1 г бромтимолового синего.

Растворим в спирте 96 %.

Предназначен для колориметрического определения концентрации водородных ионов.

Индикатор изменяет окраску в интервале pH 1,0 – 10,0

pH	Окраска	pH	Окраска
1,0	красно-фиолетовая	6,0	зеленовато-желтая
2,0	розово-оранжевая	7,0	желто-зеленая
3,0	оранжевая	8,0	зеленая
4,0	желто-оранжевая	9,0	сине-зеленая
5,0	желтая	10,0	серовато-синяя

Универсального индикатора раствор.

Содержимое пробирки (единичная упаковка) растворяют в 100 мл спирта 80 % при нагревании на горячей (до температуры 50 °С) водяной бане.

Уридин. [58-96-8]. $C_9H_{12}N_2O_6$. (М.м. 244,20).

1-(β-D-Рибофуранозил)пиримидин-2,4(1*H*,3*H*)-дион.

Кристаллический порошок белого или почти белого цвета.

Растворим в воде.

Температура плавления. Около 165 °С.

Уротропин. См. **Гексаметилентетрамин**.

Феназон. [60-80-0]. $C_{11}H_{12}N_2O$. (М.м. 188,23).

1,5-Диметил-2-фенил-1,2-дигидро-3*H*-пиразол-3-он.

Бесцветные кристаллы или белый кристаллический порошок.

Очень легко растворим в воде.

Температура плавления: 109–111°С.

Фенантрен. [85-01-8]. $C_{14}H_{10}$. (М.м. 178,23).

Фенантрен.

Кристаллы белого цвета.

Практически нерастворим в воде, легко растворим в эфире, умеренно растворим в спирте 96 %.

Температура плавления. Около 100 °С.

Фенантролина гидрохлорид. [3829-86-5]. $C_{12}H_8N_2 \cdot HCl \cdot H_2O$. (М.м. 234,68).

1,10-Фенантролина гидрохлорид, моногидрат.

Порошок белого или почти белого цвета.

Легко растворим в воде, растворим в спирте 96 %.

Температура плавления. Около 215 °С с разложением.

Фенантролина сульфат. [4199-91-1]. $C_{12}H_8N_2 \cdot H_2SO_4$. (М.м. 278,28).

1,10-Фенантролина сульфат (1:1).

Порошок белого цвета с желтоватым оттенком.

Растворим в воде, практически нерастворим в спирте 96 %.

В качестве окислительно-восстановительного индикатора используется комплекс *о*-фенантролина сульфата с железом(II) – **Ферроин**.

***о*-Фенантролина сульфата раствор**.

0,7 г железа(II) сульфата растворяют в 100 мл воды, прибавляют 2,2 г *о*-фенантролина сульфата и перемешивают до растворения.

Фенилгидразина гидрохлорид. [59-88-1]. $C_6H_8N_2 \cdot HCl$. (М.м. 144,60).

Фенилгидразина гидрохлорид.

Кристаллический порошок белого или почти белого цвета, под действием воздуха приобретает коричневую окраску.

Растворим в воде и спирте 96 %.

Температура плавления. Около 245 °С с разложением.

Хранят в защищенном от света месте.

Фенилгидразина гидрохлорида раствор 0,4 %.

0,2 г фенилгидразина гидрохлорида помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 25 мл воды, перемешивают до полного растворения и доводят объём раствора водой до метки. Срок годности раствора 8 ч.

Фенилгидразина гидрохлорида раствор 0,36 %.

0,9 г фенилгидразина гидрохлорида растворяют в 50 мл воды, обесцвечивают углем активированным и фильтруют. К фильтрату прибавляют 30 мл хлористоводородной кислоты 25 % и доводят объём раствора водой до 250,0 мл.

Фенилгидразина раствор в серной кислоте 0,1 %.

0,1 г фенилгидразина гидрохлорида растворяют в 100 мл охлажденной смеси из равных объёмов серной кислоты концентрированной и воды. Используют свежеприготовленным.

Фенилгидразина раствор в серной кислоте 0,065 %.

65 мг фенилгидразина гидрохлорида, предварительно перекристаллизованного из спирта (85 %, о/о), растворяют в смеси растворителей вода – серная кислота концентрированная 80:170 и доводят объём раствора той же смесью растворителей до 100,0 мл.

Готовят непосредственно перед использованием.

α-Фенилглицин. [2835-06-5]. $C_8H_9NO_2$. (М.м. 151,16).

(2*RS*)-2-Амино-2-фенилуксусная кислота.

Содержит не менее 95 % $C_8H_9NO_2$.

Белый или почти белый кристаллический порошок или бесцветные кристаллы.

Растворим в воде и этаноле, мало растворим в эфире.

D-α-Фенилглицин. [875-74-1]. $C_8H_9NO_2$. (М.м. 151,16).

(2*R*)-2-Амино-2-фенилуксусная кислота.

Содержит не менее 99 % $C_8H_9NO_2$.

Белый или почти белый кристаллический порошок или бесцветные кристаллы.

Растворим в воде и этаноле, мало растворим в эфире.

Температура плавления. Около 300 °С (с разложением).

***n*-Фенилендиамина дигидрохлорид**. [615-28-1]. $C_6H_8N_2 \cdot 2HCl$.

(М.м. 181,06).

Бензол-1,4-диамина дигидрохлорид.

Кристаллический порошок или кристаллы белого цвета или слегка окрашенные. На воздухе краснеет.

Легко растворим в воде, мало растворим в спирте 96 % и эфире.

Фенилизотиоцианат. [103-72-0]. C_7H_5NS. (М.м. 135,19).

Изотиоцианатобензол.

Бесцветная жидкость. Практически нерастворим в воде, растворим в спирте 96 %.

d_{20}^{20}. Около 1,13.

n_D^{20}. Около 1,65.

Температура кипения. Около 221 °С.

Температура плавления. Около – 21 °С.

Феноксибензамина гидрохлорид. [63-92-3]. $C_{18}H_{22}ClNO \cdot HCl$. (М.м. 340,29).

(2*RS*)-*N*-Бензил-1-фенокси- *N*-(2-хлорэтил)пропан-2-амина гидрохлорид.

Содержит от 97,0 % до 103,0 % $C_{18}H_{23}Cl_2NO$ в пересчете на сухое вещество.

Кристаллический порошок белого или почти белого цвета.

Умеренно растворим в воде, легко растворим в спирте 96 %.

Температура плавления. Около 138 °С.

Феноксиуксусная кислота. [122-59-8]. $C_8H_8O_3$. (М.м. 152,15).

Феноксиуксусная кислота.

Кристаллы почти белого цвета.

Умеренно растворима в воде, легко растворима в спирте 96 %, эфире и кислоте уксусной ледяной.

Температура плавления. Около 98 °С.

Феноксиэтанол. [122-99-6]. $C_8H_{10}O_2$. (М.м. 138,16).

2-Феноксиэтан-1-ол.

Прозрачная, бесцветная маслянистая жидкость.

Мало растворим в воде, легко растворим в спирте 96 % и эфире.

d_{20}^{20}. Около 1,11.

n_D^{20}. От 1,537.

Температура затвердевания. Не ниже 12 °С.

Фенол. [108-95-2]. C_6H_6O. (М.м. 94,11). Фенол.

Бесцветные или слегка розовые, или слегка желтоватые кристаллы, или кристаллическая масса, поглощающая влагу.

Растворим в воде, очень легко растворим в спирте 96 %, глицерине и метиленхлориде. При попадании на кожу вызывает раздражение.

Феноловый красный. [143-74-8]. $C_{19}H_{14}O_5S$. (М.м. 354,38). 3,3-Бис(4-гидроксифенил)-3*H*-2,1λ^6-бензоксатиол-1,1-дион.

Мелкодисперсный порошок темно-красного цвета.

Умеренно растворим в воде, растворим в спирте 96 % и ацетоне, легко растворим в разведённых растворах гидроксидов и углекислых солей щелочных металлов, практически нерастворим в хлороформе и эфире.

Переход окраски раствора от желтой к красной в интервале pH 6,8–8,4.

Фенолового красного раствор 0,1 %.

0,1 г фенолового красного растворяют в смеси 2,82 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида и 20 мл спирта 96 %, доводят объём раствора водой до 100 мл.

Испытание на чувствительность. К 100 мл воды, свободной от углерода диоксида, прибавляют 0,1 мл раствора фенолового красного; появляется желтое окрашивание, которое должно перейти в красно-фиолетовое при прибавлении не более 0,1 мл 0,02 М раствора натрия гидроксида.

Переход окраски от желтой до красновато-фиолетовой в интервале pH 6,8 – 8,4.

Фенолового красного раствор 0,04 %.

0,1 г фенолового красного растворяют в 14,2 мл 0,02 М раствора натрия гидроксида и доводят объём раствора свежепрокипяченной и охлажденной водой до 250,0 мл.

Фенолового красного раствор 0,0033 %.

Раствор I. 33 мг фенолового красного растворяют в 1,5 мл 8,5 % раствора натрия гидроксида и доводят объём раствора водой до 50 мл.

Раствор II. 50 мг аммония сульфата растворяют в 235 мл воды, прибавляют 105 мл 8,5 % раствора натрия гидроксида и 135 мл уксусной кислоты разведённой 12 %.

Раствор II смешивают с 25 мл раствора I. Если необходимо, доводят pH раствора до 4,7 с помощью 8,5 % раствора натрия гидроксида.

Фенолового красного раствор 0,00165 %.

Раствор I. 33 мг фенолового красного растворяют в 1,5 мл 8,5 % раствора натрия гидроксида и доводят объём раствора водой до 100,0 мл.

Раствор II. 25 мг аммония сульфата растворяют в 235 мл воды, прибавляют 105 мл 8,5 % раствора натрия гидроксида и 135 мл уксусной кислоты разведённой 12 %.

Раствор II смешивают с 25 мл раствора I. Если необходимо, доводят pH раствора до 4,7 с помощью 8,5 % раствора натрия гидроксида.

Фенолового красного спиртовой раствор 0,1 %.

0,1 г фенолового красного растворяют в 50 мл спирта 96 % при нагревании на горячей водяной бане и после охлаждения доводят объём раствора водой до 100,0 мл.

Феноловый красный водорастворимый. [34487-61-1]. $C_{19}H_{13}NaO_5S$. (М.м. 376,36).

2-[(4-Гидроксифенил)(4-оксоциклогекса-2,5-диен-1-илиден)метил] бензолсульфонат натрия.

Натриевая соль фенолсульфофталеина. (Взамен аммониевой соли).

Порошок красно-коричневого цвета.

Растворим в воде.

Переход окраски раствора от желтой к красной в интервале pH 6,8 – 8,4.

Фенолового красного водорастворимого раствор. 0,04 % раствор.

Фенолфталеин. [77-09-8]. $C_{20}H_{14}O_4$. (М.м. 318,32).

3,3-Бис(4-гидроксифенил)-2-бензофуран-1(3*H*)-он.

Порошок от белого до желтовато-белого цвета.

Практически нерастворим в воде, растворим в спирте 96 %.

Фенолфталеина раствор 0,1 %.

0,1 г фенолфталеина растворяют в 80 мл спирта 96 % и доводят объём раствора водой до 100 мл.

Испытание на чувствительность. К 100 мл воды, свободной от углерода диоксида, прибавляют 0,1 мл раствора фенолфталеина; при прибавлении не более 0,2 мл 0,02 М раствора натрия гидроксида окраска раствора должна измениться от бесцветной до розовой.

Переход окраски от бесцветной до ярко-розовой в интервале pH 8,2 – 10,0.

Фенолфталеина раствор 1 %. Раствор 10 г/л в спирте 96 %.

Фенхлорфос. [299-84-3]. $C_8H_8Cl_3O_3PS$. (М.м. 321,55).

O,*O*-Диметил-*O*-(2,4,5-трихлорфенил)тиофосфат.

Температура плавления. Около 35 °С.

Фенхон. [7787-20-4]. $C_{10}H_{16}O$. (М.м. 152,23).

(1*R*,4*S*)-1,3,3-Триметилбицикло[2.2.1]гептан-2-он.

Маслянистая жидкость.

Смешивается со спиртом 96 % и эфиром, практически нерастворим в воде.

Температура кипения. Около 193 °С.

n_D^{20}. Около 1,46.

Хроматографическая чистота фенхона, используемого в газовой хроматографии, должна быть не менее 98,0 %.

Ферроин. [14634-91-4]. $C_{36}H_{24}FeN_6O_4S$. (М.м. 692,5).

Сульфат трис(1,10-фенантролин)железа(II).

0,70 г железа(II) сульфата и 1,76 г фенантролина гидрохлорида растворяют в 70 мл воды и доводят объём раствора тем же растворителем до 100 мл. *Испытание на чувствительность*. К 50 мл серной кислоты разведённой 9,8 % прибавляют 0,15 мл раствора осмия(VIII) оксида и 0,1 мл ферроина. После прибавления 0,1 мл 0,1 М раствора аммония церия нитрата окраска раствора должна измениться от красной до голубой.

Ферроцифен. [14768-11-7]. $C_{26}H_{16}FeN_6$. (М.м. 468,3). Бисцианобис(1,10-фенантролин)железо(II).

Кристаллический порошок фиолетово-бронзового цвета.

Практически нерастворим в воде и спирте 96 %.

Хранят в сухом защищенном от света месте.

Флороглюцин. [6099-90-7]. $C_6H_6O_3 \cdot 2H_2O$. (М.м. 162,14). Бензол-1,3,5-триол, дигидрат.

Кристаллы белого или желтоватого цвета.

Мало растворим в воде, растворим в спирте 96 %.

Температура плавления. Около 223 °С (метод мгновенного плавления).

Флороглюцина раствор 1 %.

К 1 мл раствора 100 г/л флороглюцина в спирте 96 % прибавляют 9 мл хлористоводородной кислоты 25 %.

Хранят в защищенном от света месте.

Флороглюцина раствор.

0,1 г флороглюцина растворяют в смеси из 8 мл спирта 96 % и 8 мл хлористоводородной кислоты 25 %. При смачивании этим раствором сосновая лучинка должна окрашиваться в красный цвет. Готовят непосредственно перед использованием.

Флороглюцина раствор в эфире 0,1 %.

0,1 г флорглюцина растворяют в эфире и разводят эфиром до 100,0 мл.

Готовят непосредственно перед использованием.

Флороглюцина раствор в серной кислоте.

1,5 г флорглюцина растворяют при осторожном нагревании в смеси из 75 г воды и 50 г серной кислоты концентрированной.

Флуорантен. [206-44-0]. $C_{16}H_{10}$. (М.м. 202,24). Флуорантен.

Кристаллы от желтого до желтовато-коричневого цвета.

Практически нерастворим в воде, очень мало растворим в эфире, растворим в хлороформе и бензоле.

Температура кипения. Около 384 °С.

Температура плавления. От 105 до 110 °С.

Флуоресцеин. [2321-07-5]. $C_{20}H_{12}O_5$. (М.м. 332,31).

3',6'-Дигидрокси-3*H*-спиро[2-бензофуран-1,9'-ксантен]-3-он.

Порошок оранжево-красного цвета.

Практически нерастворим в воде и эфире, растворим в теплом спирте 96 % и растворах гидроксидов щелочных металлов.

В растворе флуоресцеин обнаруживает зеленую флуоресценцию.

Температура плавления. Около 315 °С.

Флуфенаминовая кислота. [530-78-9]. $C_{14}H_{10}F_3NO_2$. (М.м. 281,23).

2-[3-(Трифторметил)анилино]бензойная кислота.

Кристаллический порошок или игольчатые кристаллы бледно-желтого цвета.

Практически нерастворима в воде, легко растворима в спирте 96 %.

Температура плавления. От 132 до 135 °С.

Формалин. См. **Формальдегида раствор 35 %.**

Формалин технический.

Бесцветная прозрачная жидкость, при хранении допускается образование помутнения или белого осадка.

Формальдегид. [50-00-0]. CH_2O. (М.м. 30,03). Формальдегид.

Формальдегида раствор 35 %.

Прозрачная бесцветная жидкость, смешивается с водой и спиртом 96 %.

При хранении возможно появление помутнения.

Формальдегида раствор в серной кислоте.

2 мл 35 % раствора формальдегида смешивают с 100 мл серной кислоты концентрированной.

Формамид. [75-12-7]. CH_3NO. (М.м. 45,04). Формамид.

Прозрачная, бесцветная, маслянистая, гигроскопичная жидкость.

Смешивается с водой и спиртом 96 %. Гидролизуется в воде.

Температура кипения. Около 103 °С. Определение проводят при давлении 2 кПа.

Хранят в воздухонепроницаемой упаковке.

Формамид обработанный.

1,0 г кислоты сульфаминовой диспергируют в 20,0 мл формамида, содержащего 5 % (о/о) воды.

***N*-Формилцитизин**. [53007-06-0]. $C_{12}H_{14}N_2O_2$. (М.м. 218,25).

(1*R*,5*S*)-8-Оксо-1,5-метано-1,3,4,5,6,8-гексагидро-2*H*-пиридо[1,2-*a*][1,5]диазоцин-2-карбальдегид.

Вещество белого или почти белого цвета.

Температура плавления: 165–167 °С.

Фосфолипиды.

Определенное количество мозга человеческого или бычьего, хорошо отделенного от кровеносных сосудов, промывают и разжижают в подходящем устройстве. От 1000 до 1300 г разжиженного вещества взвешивают, измеряют объём (V, мл), затем экстрагируют 3 порциями по 4V мл ацетона, и фильтруют при пониженном давлении; полученный остаток сушат при температуре 37 °С в течение 18 ч; затем остаток экстрагируют

смесью растворителей петролейный эфир (3) – петролейный эфир (2) 2:3, двумя порциями по 2 мл, фильтруя каждый экстракт через фильтровальную бумагу, предварительно увлажненную той же смесью растворителей. Объединенные извлечения выпаривают досуха при температуре 45 °С и давлении не более 670 Па. Остаток растворяют в $0{,}2V$ мл эфира и выдерживают при температуре 4 °С до образования осадка. Прозрачную надосадочную жидкость центрифугируют, выпаривают при пониженном давлении до объёма 100 мл на килограмм разжиженного вещества и взвешивают. Выдерживают при температуре 4 °С до образования осадка (от 12 до 24 ч) и центрифугируют. К прозрачной надосадочной жидкости прибавляют ацетон в количестве, в 5 раз превышающем ее объём, центрифугируют и отбрасывают надосадочную жидкость. Осадок сушат.

Хранят в эксикаторе под вакуумом, в защищенном от света месте.

Фосфора(V) оксид. [1314-56-3]. P_2O_5. (М.м. 141,94). Оксид фосфора(V).

Аморфный порошок белого цвета, расплывающийся на воздухе. С водой образует гидраты с выделением тепла.

Хранят в воздухонепроницаемой упаковке.

Фосфористая кислота. [13598-36-2]. H_3PO_3. (М.м. 82,00).

Фосфористая кислота.

Содержит не менее 99 % H_3PO_3.

Плотность. Около 1,651.

Фосфорная кислота. [7664-38-2]. H_3PO_4. (М.м. 98,00).

Фосфорная кислота.

Бесцветная, прозрачная жидкость.

Содержит не менее 24,8 % и не более 25,2 % H_3PO_4.

Плотность. 1,147–1,150.

Фосфорная кислота концентрированная.

Содержит не менее 85 % H_3PO_4.

Плотность. 1,685.

Бесцветная, прозрачная жидкость или бесцветные кристаллы, расплывающиеся на воздухе.

Очень легко растворима в воде, растворима в спирте 96 %.

Фосфорная кислота разведённая 10 %.

7,0 мл фосфорной кислоты концентрированной прибавляют к 80 мл воды и доводят объём раствора водой до 100 мл. Содержание H_3PO_4 от 9,5 % до 10,5 %.

Фосфорная кислота разведённая 5 %.

3,5 мл фосфорной кислоты концентрированной прибавляют к 80 мл воды и доводят объём раствора водой до 100 мл. Содержание H_3PO_4 от 4,75 % до 5,25 %.

Фосфорная кислота разведённая 2,0 %.

1,4 мл фосфорной кислоты концентрированной прибавляют к 1,0 л воды и доводят объём раствора водой до 1,0 л. Содержание H_3PO_4 от 1,90 % до 2,10 %.

Фосфорная кислота разведённая 1,0 %.

0,7 мл фосфорной кислоты концентрированной прибавляют к 1,0 л воды и доводят объём раствора водой до 1,0 л. Содержание H_3PO_4 от 0,94 % до 1,06 %.

Фосфорная кислота разведённая 0,5 %.

3,5 мл фосфорной кислоты концентрированной прибавляют к 0,5 л воды и доводят объём раствора водой до 1,0 л. Содержание H_3PO_4 от 0,47 % до 0,53 %.

Фосфорная кислота разведённая 0,1 %.

10,0 мл фосфорной кислоты разведённой 1,0 % доводят водой до 100 мл. Раствор исаользуют свежеприготовленным.

Фосфорной кислоты раствор 2 М.

230,6 г (136,8 мл) фосфорной кислоты концентрированной осторожно прибавляют к 0,8 л воды и доводят объём раствора водой до 1,0 л.

Фосфорной кислоты раствор 1 М.

115,3 г (68,4 мл) фосфорной кислоты концентрированной осторожно прибавляют к 0,8 л воды и доводят объём раствора водой до 1,0 л.

Фосфорной кислоты раствор 0,05 М.

25,0 мл 2 М раствора фосфорной кислоты доводят водой до 1,0 л.

Фосфорновольфрамовая кислота. [12501-23-4]. $12WO_3 \cdot H_3PO_4 \cdot xH_2O$.

(М.м. 2880,1 для безводной).

Оксид вольфрама(VI)—фосфорная кислота (12/1), гидрат.

Белые кристаллы или белые с сероватым или желтовато-зеленым оттенком кристаллы или кристаллический порошок.

Очень мало растворима в воде, растворима в спирте 96 %.

Фосфорновольфрамовой кислоты раствор.

К 10 г натрия вольфрамата прибавляют 8 мл фосфорной кислоты 85 % и 75 мл воды, нагревают с обратным холодильником в течение 3 ч, охлаждают и доводят объём раствора водой до 100,0 мл.

Фосфорновольфрамовой кислоты раствор 3 %.

0,3 г фосфорновольфрамовой кислоты растворяют в 0,8 мл хлористоводородной кислоты разведённой 8 % и доводят водой до 10,0 мл. В случае получения мутного раствора его фильтруют через двойной фильтр.

Фосфорновольфрамовой кислоты спиртовой раствор 20 %.

20 г форфорновольфрамовой кислоты растворяют в 100 мл спирта 96 % при легком нагревании.

Фосфорномолибденовая кислота. [51429-74-4]. $12MoO_3 \cdot H_3PO_4 \cdot xH_2O$.

(М.м. 1825,3 для безводной).

Оксид молибдена(VI)—фосфорная кислота (12/1), гидрат

Мелкие кристаллы оранжево-желтого цвета.

Легко растворима в воде, растворима в спирте 96 % и эфире.

Фосфорномолибденовой кислоты раствор 4 %.

4 г фосфорномолибденовой кислоты растворяют в воде, доводят объём раствора тем же растворителем до 40 мл. Осторожно при охлаждении прибавляют 60 мл серной кислоты концентрированной.

Готовят непосредственно перед использованием.

Фосфорномолибденовой кислоты спиртовой раствор 10 %. 10 г фосфорномолибденовой кислоты растворяют в спирте 96 % и доводят объём раствора тем же растворителем до 100 мл.

Раствор готовят непосредственно перед использованием.

Фосфорномолибденовой кислоты спиртовой раствор 5 %. 5 г фосфорномолибденовой кислоты растворяют в спирте 96 % и доводят объём раствора тем же растворителем до 100 мл.

Раствор готовят непосредственно перед использованием.

Фосфорномолибденовой кислоты уксуснокислый раствор 5 %. 5 г фосфорномолибденовой кислоты растворяют в смеси серная кислота концентрированная—уксусная кислота ледяная 1:20 и доводят объём раствора тем же растворителем до 100 мл.

Раствор готовят непосредственно перед использованием.

Фосфорномолибденово-вольфрамовый реактив. См. **Реактив Фолина-Чокальтеу.**

Фосфорномолибденово-вольфрамовый реактив разведённый. См. **Реактив Фолина-Чокальтеу разведённый.**

Фталазин. [253-52-1]. $C_8H_6N_2$. (М.м. 130,15). Фталазин.

Кристаллы бледно-желтого цвета.

Легко растворим в воде, растворим в этаноле, этилацетате и метаноле, умеренно растворим в эфире.

Температура плавления. От 89 до 92 °С.

Фталевая кислота. [88-99-3]. $C_8H_6O_4$. (М.м. 166,13). Бензол-1,2-дикарбоновая кислота.

Растворима в горячей воде и спирте 96 %.

Фталевый альдегид. [643-79-8]. $C_8H_6O_2$. (М.м. 134,13). Бензол-1,2-дикарбальдегид.

Кристаллический порошок желтого цвета.

Мало растворим в воде, умеренно растворим в горячей воде, растворим в спирте 96 % и эфире.

Температура плавления. Около 55 °С.

Хранят в защищенном от света месте, без доступа воздуха.

Фталевого альдегида реактив.

2,47 г борной кислоты растворяют в 75 мл воды, доводят pH до 10,4 45 % раствором калия гидроксида и доводят объём раствора водой до 100,0 мл.

1,0 г фталевого альдегида растворяют в 5 мл метанола, прибавляют 95 мл приготовленного раствора борной кислоты и 2 мл тиогликолевой кислоты и доводят pH до 10,4 45 % раствором калия гидроксида.

Хранят в защищенном от света месте.

Срок годности 3 сут.

Фталевый ангидрид. [85-44-9]. $C_8H_4O_3$. (М.м. 148,12). 2-Бензофуран-1,3-дион.

Содержит не менее 99,0 % $C_8H_4O_3$.

Хлопья белого цвета.

Очень мало растворим в воде, растворим в спирте 96 %.

Температура плавления. От 130 до 132 °С.

Количественное определение. 2,000 г растворяют в 100 мл воды, кипятят с обратным холодильником в течение 30 мин, охлаждают и титруют 1 М раствором натрия гидроксида, используя в качестве индикатора раствор фенолфталеина.

1 мл 1 М раствора натрия гидроксида соответствует 74,05 мг $C_8H_4O_3$.

Фталевого ангидрида раствор.

42 г фталевого ангидрида растворяют в 300 мл пиридина безводного и выдерживают в течение 16 ч.

Хранят в защищенном от света месте.

Срок годности 7 сут.

Фталеиновый пурпурный. [2411-89-4]. $C_{32}H_{32}N_2O_{12}\cdot xH_2O$.

(М.м. 636,6, для безводного).

2,2',2",2"'-{(3-Оксо-1,3-дигидро-2-бензофуран-1,1-диил)бис[(6-гидрокси-5-метил-3,1-фенилен)метиленнитрило]}тетрауксусная кислота.

Порошок от желтовато-белого до коричневатого цвета.

Практически нерастворим в воде, растворим спирте 96 %.

Реактив поступает в продажу в виде натриевой соли: порошок от желтовато-белого до коричневатого цвета; растворим в воде, практически нерастворим в спирте 96 %.

Испытание на чувствительность. 10 мг фталеинового пурпурного растворяют в 1 мл раствора аммиака концентрированного и доводят объём раствора водой до 100 мл. К 5,0 мл полученного раствора прибавляют 95,0 мл воды, 4,0 мл раствора аммиака концентрированного, 50,0 мл спирта 96 % и 0,1 мл 0,1 М раствора бария хлорида; появляется сине-фиолетовое окрашивание, которое должно обесцветиться после прибавления 0,15 мл 0,1 М раствора натрия эдетата.

Фталеинового пурпурного раствор 0,5 %. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 0,5 г фталеинового пурпурного, растворяют в воде и доводят объём раствора водой до метки.

2-Фтор-2-деокси-D-глюкоза. [86783-82-6]. $C_6H_{11}FO_5$. (М.м. 182,15).

2-Фтор-2-дезокси-D-глюкопираноза.

Кристаллический порошок.

Температура плавления. От 174 до 176 °С.

Фтординитробензол. [70-34-8]. $C_6H_3FN_2O_4$. (М.м. 186,10).

2,4-Динитро-1-фторбензол.

Кристаллы бледно-желтого цвета.

Растворим в эфире и пропиленгликоле.

Температура плавления. Около 29 °С.

1-Фтор-2-нитро-4-(трифторметил)бензол. [367-86-2]. $C_7H_3F_4NO_2$.

(М.м. 209,10). 2-Нитро-4-(трифторметил)-1-фторбензол.

Желтовая кристаллическая масса.

Практически нерастворим в воде, растворим в этаноле и эфире.

Температура плавления. Около 197 °С.

Фтористоводородная кислота. [7664-39-3]. HF. (М.м. 20,01).

Фтористоводородная кислота.

Содержит не менее 40,0 % (м/м) HF.

Прозрачная, бесцветная жидкость.

Остаток после прокаливания. Не более 0,05 % (м/м); кислоту фтористоводородную выпаривают в платиновом тигле, остаток осторожно прокаливают до постоянной массы.

Хранят в полиэтиленовой упаковке.

Фукоза. [6696-41-9]. $C_6H_{12}O_5$. (М.м. 164,16). 6-Дезокси-L-галактопираноза.

Порошок белого цвета.

Растворима в воде и спирте 96 %.

$[\alpha]_D^{20}$. Около – 76° (9 % раствор, через 24 ч после приготовления).

Температура плавления. Около 140 °С.

Фуксин основной. [632-99-5]. $C_{20}H_{19}N_3 \cdot HCl$. (М.м. 337,85). 4-[(4-Аминофенил)(4-иминоциклогекса-2,5-диен-1-илиден)метил]-2-метиланилина гидрохлорид и [569-61-9]. $C_{19}H_{17}N_3 \cdot HCl$. (М.м. 323,82). 4,4'-[(4-Иминоциклогекса-2,5-диен-1-илиден)метилен]дианилина гидрохлорид

Кристаллы с зеленовато-бронзовым блеском.

Растворим в воде и спирте 96 %.

При необходимости очищают следующим образом: 1 г фуксина основного растворяют в 250 мл хлористоводородной кислоты разведённой 7,3 %, выдерживают в течение 2 ч при комнатной температуре, фильтруют, полученный фильтрат нейтрализуют раствором натрия гидроксида разведённым 8,5 % и прибавляют его избыток от 1 до 2 мл. Фильтруют через стеклянный фильтр (40), осадок промывают водой, растворяют в 70 мл метанола, предварительно нагретого до кипения, и прибавляют 300 мл воды

при температуре 80 °С. Охлаждают и фильтруют; кристаллы сушат в вакууме.

Хранят в защищенном от света месте.

Фуксина обесцвеченный раствор 0,1 %.

0,1 г фуксина основного растворяют в 60 мл воды, прибавляют раствор, содержащий 1 г натрия сульфита безводного или 2 г натрия сульфита в 10 мл воды. Медленно при постоянном перемешивании прибавляют 2 мл хлористоводородной кислоты концентрированной, доводят объём раствора водой до 100 мл.

Выдерживают в защищенном от света месте в течение не менее 12 ч, обесцвечивают углем активированным и фильтруют. Если раствор мутнеет, его фильтруют перед использованием. Если при выдерживании раствора появляется фиолетовое окрашивание, его снова обесцвечивают углем активированным.

Испытание на чувствительность. К 1,0 мл полученного раствора прибавляют 1,0 мл воды и 0,1 мл спирта 96 %, свободного от альдегидов. Прибавляют 0,2 мл раствора, содержащего 0,01 % формальдегида. В течение 5 мин должно появиться светло-розовое окрашивание раствора.

Хранят в защищенном от света месте.

Фуксина обесцвеченный раствор 1 %.

К 1,0 г фуксина основного прибавляют 100 мл воды, нагревают до температуры 50 °С и охлаждают, периодически перемешивая. Выдерживают в течение 48 ч, перемешивают и фильтруют. К 4 мл фильтрата прибавляют 6 мл хлористоводородной кислоты концентрированной, перемешивают и доводят объём раствора водой до 100,0 мл.

Раствор используют через 1 ч после приготовления.

Фуксинсернистой кислоты раствор.

1,0 г фуксина основного растворяют при нагревании в 600 мл воды, фильтруют и охлаждают в бане со льдом. К охлажденному фильтрату медленно прибавляют 100 мл 20 % раствора натрия сульфита, колбу

закрывают пробкой и встряхивают. Затем раствор охлаждают в бане со льдом и постепенно при встряхивании прибавляют небольшими порциями хлористоводородную кислоту 25 % до исчезновения розовой окраски (примерно 10 – 13 мл). Объём раствора доводят водой до метки и тщательно перемешивают.

Слегка окрашенный раствор помещают в защищенное от света место. Применяться должен не ранее, чем на другой день после приготовления, когда раствор станет совершенно бесцветным.

Хранят в защищенном от света месте.

Примечание. Если после прибавления хлористоводородной кислоты раствор остается окрашенным, его встряхивают с 0,2 – 0,3 г активированного угля и тотчас фильтруют.

Фумаровая кислота. [110-17-8]. $C_4H_4O_4$. (М.м. 116,07).

(2*E*)-Бут-2-ендиовая кислота.

Содержит не менее 99,0 % $C_4H_4O_4$.

Белые или почти белые кристаллы, растворима в спирте 96 %, мало растворима в воде и ацетоне.

Температура плавления. Около 300 °С.

Фурфурол. [98-01-1]. $C_5H_4O_2$. (М.м. 96,08). Фуран-2-карбальдегид.

Прозрачная, маслянистая жидкость, бесцветная или коричневато-желтого цвета.

Смешивается с 11 частями воды, смешивается со спиртом 96 % и эфиром.

d_{20}^{20}. От 1,155 до 1,161.

Температурные пределы перегонки. От 159 до 163 °С; должно перегоняться не менее 95 %.

Хранят в темном месте.

Хальконкарбоновая кислота. [3737-95-9]. $C_{21}H_{14}N_2O_7S \cdot 3H_2O$. (М.м. 492,5).

3-Гидрокси-4-[(2-гидрокси-4-сульфонафталин-1-ил)диазенил]нафталин-2-карбоновая кислота.

Порошок коричневато-черного цвета.

Мало растворима в воде, очень мало растворима в ацетоне и спирте 96 %, умеренно растворима в разведённых растворах натрия гидроксида, растворима в спирте 50 % и ацетоне 50 %.

При pH больше 12,0 имеет голубую окраску, а его компоненты с ионом кальция в тех же условиях – красновато-сиреневую.

Переход окраски при прямом титровании от красновато-сиреневой к голубой.

Хальконкарбоновой кислоты индикаторная смесь.

Смешивают 1 часть хальконкарбоновой кислоты с 99 частями натрия хлорида.

Испытание на чувствительность. 50 мг индикаторной смеси хальконкарбоновой кислоты растворяют в смеси 2 мл 20 % раствора натрия гидроксида и 100 мл воды; появляется голубое окрашивание, которое переходит в фиолетовое при прибавлении 1 мл 1 % раствора магния сульфата и 0,1 мл 0,15 % раствора 1,5 г/л кальция хлорида; при прибавлении 0,15 мл 0,01 М раствора натрия эдетата вновь появляется голубое окрашивание.

Хальконкарбоновой кислоты – раствор индикатора.

0,025 г индикатора растворяют в 100 мл спирта 50 % или ацетона.

Срок годности раствора индикатора 2 мес.

Хинальдиновый красный. [117-92-0]. $C_{21}H_{23}IN_2$. (М.м. 430,3).

2-{2-[4-(Диметиламино)фенил]этенил}-1-этилхинолин-1-ий иодид.

Порошок темного синевато-черного цвета.

Умеренно растворим в воде, легко растворим в спирте 96 %.

Хинальдинового красного раствор.

0,1 г хинальдинового красного растворяют в метаноле и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл.

Переход окраски от бесцветной до красной в интервале pH 1,4 – 3,2.

Хингидрон. [106-34-3]. $C_{12}H_{10}O_4$. (М.м. 218,21).

Циклогекса-2,5-диен-1,4-дион—бензол-1,4-диол (1/1).

Блестящие кристаллы или кристаллический порошок темно-зеленого цвета. Мало растворим в воде, умеренно растворим в горячей воде, растворим в спирте 96 %, растворе аммиака концентрированного и эфире.

Температура плавления. Около 170 °С.

Хинидин. [56-54-2]. $C_{20}H_{24}N_2O_2$. (М.м. 324,42). (*S*)-(6-Метоксихинолин-4-ил)[(2*R*,4*S*,5*R*)-5-этенил-1-азабицикло[2.2.2]октан-2-ил]метанол.

Кристаллический порошок белого цвета.

Очень мало растворим в воде, умеренно растворим в спирте 96 %, мало растворим в эфире и метаноле.

$[\alpha]_D^{20}$. Около + 260° (1 % раствор в этаноле).

Температура плавления. Около 172 °С.

Хранят в защищенном от света месте.

Хинин. [130-95-0]. $C_{20}H_{24}N_2O_2$. (М.м. 324,42). (*R*)-(6-Метоксихинолин-4-ил)[(2*S*,4*S*,5*R*)-5-этенил-1-азабицикло[2.2.2]октан-2-ил]метанол.

Микрокристаллический порошок белого цвета.

Очень мало растворим в воде, мало растворим в кипящей воде, очень легко растворим в этаноле, растворим в эфире.

$[\alpha]_D^{20}$. Около – 67° (1 % раствор в этаноле).

Температура плавления. Около 175 °С.

Хранят в защищенном от света месте.

Хлоралгидрат. [302-17-0]. $C_2H_3Cl_3O_2$. (М.м. 165,40).

2,2,2-Трихлорэтан-1,1-диол.

Бесцветные прозрачные кристаллы или мелкокристаллический порошок. Гигроскопичен при повышенной влажности.

Очень легко растворим в спирте 96 % и эфире, растворим в хлороформе.

Хлоралгидрата раствор. Раствор 80 г в 20 мл воды.

Хлорамин. [127-52-6]. $C_6H_5ClNNaO_2S{\cdot}xH_2O$. (М.м. 213,62 для безводного).

N-(Фенилсульфонил)-*N*-хлоразанид натрия, гидрат.

Белые или слегка желтоватые кристаллы или кристаллический порошок со слабым запахом хлора.

Хлорамин Б. См. **Хлорамин**.

Хлорамина раствор 5 %.

5 г хлорамина растворяют в воде и доводят объём раствора водой до 100 мл. Используют свежеприготовленным.

Хлорамина раствор 2 %. Раствор 20 г/л.

Готовят непосредственно перед использованием.

Хлорамина раствор 0,1 %.

0,1 г хлорамина растворяют в воде и доводят объём раствора водой до 100 мл. Используют свежеприготовленным.

Хлорамина раствор 0,02 %. Раствор 0,2 г/л хлорамина.

Готовят непосредственно перед использованием.

Хлорамина раствор 0,01 %. Раствор 0,1 г/л хлорамина.

Готовят непосредственно перед использованием.

Хлоранилин. [106-47-8]. C_6H_6ClN. (М.м. 127,57). 4-Хлоранилин.

Кристаллы.

Растворим в горячей воде, легко растворим в спирте 96 % и эфире.

Температура плавления. Около 71 °С.

Хлорацетанилид. [539-03-7]. C_8H_8ClNO. (М.м. 169,61).

N-(4-Хлорфенил)ацетамид.

Кристаллический порошок.

Практически нерастворим в воде, растворим в спирте 96 %.

Температура плавления. Около 178 °С.

4-Хлорбензолсульфонамид. [98-64-6]. $C_6H_6ClNO_2S$. (М.м. 191,64).

4-Хлорбензолсульфонамид.

Порошок белого цвета. Растворим в спирте 96 % и эфире.

Температура плавления. Около 145 °С.

Хлорбутанол. [57-15-8]. $C_4H_7Cl_3O \cdot 0{,}5H_2O$. (М.м. 186,46).

2-Метил-1,1,1-трихлорпропан-2-ол гемигидрат.

Белый кристаллический порошок или бесцветные кристаллы, быстро сублимирующиеся.

Умеренно растворим в воде, очень легко растворим в спирте 96 % и эфире, растворим в глицерине 85 %.

Температура плавления. Около 78 °С.

Хлористоводородная кислота концентрированная [7647-01-0]. HCl.

(М.м. 36,46).

Бесцветная жидкость с резким запахом, дымящая на воздухе.

Содержит не менее 35 % и не более 38 % HCl (м/м).

Плотность. 1,174–1,189.

Хлористоводородная кислота 30 %.

Смешивают хлористоводородную кислоту концентрированную с водой в соотношении 5:1.

Хлористоводородная кислота 25 %.

70 г хлористоводородной кислоты концентрированной приливают к 25 мл воды и доводят тем же растворителем до 100,0 мл.

Хлористоводородная кислота разведённая 10 %.

28 г хлористоводородной кислоты концентрированной приливают к 65 мл воды и доводят тем же растворителем до 100,0 мл.

Хлористоводородная кислота разведённая 8,3 %.

1 объём хлористоводородной кислоты 25 % приливают к 2 объёмам воды.

Хлористоводородная кислота разведённая 7,3 %.

Содержит 73 г/л HCl.

20 г хлористоводородной кислоты концентрированной приливают к 75 мл воды и доводят тем же растворителем до 100,0 мл.

Хлористоводородная кислота 2 %.

5,6 г хлористоводородной кислоты концентрированной приливают к 90 мл воды и доводят тем же растворителем до 100,0 мл.

Хлористоводородная кислота 1 %.

10 мл хлористоводородной кислоты разведённой 10 % доводят водой до 100,0 мл.

Хлористоводородная кислота разведённая 0,037 %.

Содержит 0,37 г/л HCl.

1,0 мл хлористоводородной кислоты разведённой 7,3 % доводят водой до 200,0 мл.

Хлористоводородная кислота разведённая 0,11 %.

30 мл 1 М раствора хлористоводородной кислоты доводят водой до 1000,0 мл; pH раствора 1,6±0,1.

Хлористоводородной кислоты раствор 7 М.

700 г хлористоводородной кислоты концентрированной приливают к 250 мл воды и доводят тем же растворителем до 1000,0 мл.

Хлористоводородной кислоты раствор 6 М.

600 г хлористоводородной кислоты концентрированной приливают к 350 мл воды и доводят тем же растворителем до 1000,0 мл.

Хлористоводородной кислоты раствор 3 М.

300 г хлористоводородной кислоты концентрированной приливают к 650 мл воды и доводят тем же растворителем до 1000,0 мл.

Хлористоводородной кислоты раствор 2 М.

200 г хлористоводородной кислоты концентрированной приливают к 750 мл воды и доводят тем же растворителем до 1000,0 мл.

Хлористоводородной кислоты раствор 1 М.

100 г хлористоводородной кислоты концентрированной приливают к 850 мл воды и доводят тем же растворителем до 1000,0 мл.

Хлористоводородной кислоты раствор 0,5 М.

50 г хлористоводородной кислоты концентрированной приливают к 900 мл воды и доводят тем же растворителем до 1000,0 мл.

Хлористоводородной кислоты раствор 0,1 М.

10,0 мл хлористоводородной кислоты раствор 1 М доводят водой до 100,0 мл.

Используют свежеприготовленным.

Хлористоводородной кислоты раствор 0,05 М.

10,0 мл хлористоводородной кислоты раствор 0,5 М доводят водой до 100,0 мл.

Используют свежеприготовленным.

Хлористоводородной кислоты раствор 0,02 М.

2,0 мл хлористоводородной кислоты раствор 1 М доводят водой до 100,0 мл.

Используют свежеприготовленным.

Хлористоводородной кислоты раствор 0,01 М.

1,0 мл хлористоводородной кислоты раствор 1 М доводят водой до 100,0 мл.

Используют свежеприготовленным.

Хлористоводородной кислоты раствор 1% в спирте 96%.

2,8 г хлористоводородной кислоты концентрированной приливают к 95 мл спирта 96 % и доводят тем же растворителем до 100,0 мл.

Хлористоводородной кислоты раствор 0,01 М в спирте 96 %.

5,0 мл 1 М раствора хлористоводородной кислоты доводят спиртом 96 % до 500,0 мл.

Хлористоводородная кислота бромированная.

К 100 мл хлористоводородной кислоты концентрированной прибавляют 1 мл раствора брома.

Хлористоводородная кислота, свободная от свинца.

Должна выдерживать требования для хлористоводородной кислоты концентрированной и следующее дополнительное испытание.

Свинец. Не более 20 ppm.

Определение проводят методом атомно-эмиссионной спектрометрии.

Испытуемый раствор. 200 г хлористоводородной кислоты концентрированной помещают в кварцевый тигель, испаряют почти досуха, к полученному остатку прибавляют 5 мл азотной кислоты, приготовленной дистилляцией азотной кислоты концентрированной при температуре ниже температуры кипения, и выпаривают досуха. Остаток растворяют в 5 мл

азотной кислоты, приготовленной дистилляцией азотной кислоты концентрированной при температуре ниже температуры кипения.

Растворы сравнения. Готовят растворы сравнения, используя эталонный раствор свинца (0,1 ppm Pb), разведённый азотной кислотой, приготовленной дистилляцией азотной кислоты концентрированной при температуре ниже температуры кипения.

Измеряют интенсивность эмиссии при длине волны 220,35 нм.

Хлористый метилен. См. **Метиленхлорид**.

Хлорметилизопропилкарбонат. [35180-01-9]. $C_5H_9ClO_3$. (М.м. 152,58). (Пропан-2-ил)(хлорметил)карбонат.

Содержит не менее 98 % $C_5H_9ClO_3$.

Прозрачная, бесцветная жидкость.

Плотность. Около 1,15.

Температура кипения. 147,5 °С.

Хлорная кислота. [7601-90-3]. $HClO_4$. (М.м. 100,46). Хлорная кислота.

Содержит около 70 % $HClO_4$ (м/м).

Прозрачная, бесцветная или со слабым желтоватым оттенком жидкость.

Легко смешивается с водой.

Плотность. 1,664.

Хлорная кислота разведённая.

8,5 мл хлорной кислоты помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят объём раствора водой до метки.

Хлорной кислоты раствор 0,5 М.

В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 43 мл хлорной кислоты и доводят объём раствора водой очищенной до метки. Раствор хранят в склянке с притертой пробкой при температуре от 18 до 25 °С в течение 12 мес.

Хлорной кислоты раствор 0,15 М.

В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 1,3 мл хлорной кислоты и доводят объём раствора водой очищенной до метки.

Хлорной кислоты раствор 0,015 М.

В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 1,0 мл хлорной кислоты раствора 0,15 М и доводят объём раствора водой очищенной до метки.

2-Хлор-4-нитроанилин. [121-87-9]. $C_6H_5ClN_2O_2$. (М.м. 172,57).

4-Нитро-2-хлоранилин.

Кристаллический порошок желтого цвета. Легко растворим в метаноле.

Температура плавления. Около 107 °С.

Хранят в защищенном от света месте.

Хлорогеновая кислота. [327-97-9]. $C_{16}H_{18}O_9$. (М.м. 354,31).

(1*S*,3*R*,4*R*,5*R*)-1,4,5-Тригидрокси-3-{[3-(3,4-дигидроксифенил)проп-2-еноил]окси}циклогексанкарбоновая кислота.

Кристаллический порошок белого цвета.

Растворима в воде, ацетоне и этаноле.

Температура плавления. Около 208 °С.

$[\alpha]_D^{20}$. Около – 35,2°.

Хлороформ. [67-66-3]. $CHCl_3$. (М.м. 119,38). Трихлорметан.

Прозрачная, бесцветная тяжелая подвижная жидкость с характерным запахом.

Мало растворим в воде, смешивается со спиртом 96 %.

d_{20}^{20}. От 1,475 до 1,481.

Температура кипения. Около 60 °С.

Хлороформ содержит от 0,4 % (м/м) до 1,0 % (м/м) этанола.

Хлороформ безводный.

К 1 л хлороформа прибавляют 100 г кальция хлорида безводного, энергично взбалтывают и оставляют на 24 ч. Прозрачную жидкость сливают в сухую склянку с притертой пробкой.

Хлороформ подкисленный.

К 100 мл хлороформа прибавляют 10 мл хлористоводородной кислоты концентрированной, встряхивают и отстаивают до разделения на 2 слоя.

Хлороформ, свободный от этанола.

I. Промывают 200 мл хлороформа, встряхивая с 4 порциями воды по 100 мл каждая. Сушат над 20 г натрия сульфата безводного в течение 24 ч и фильтруют. Фильтрат перегоняют над 10 г натрия сульфата безводного, отбрасывая первые 20 мл отгона.

II. В течение 3 мин взбалтывают 20 мл хлороформа с 20 мл воды, хлороформный слой отделяют и промывают 2 порциями воды по 20 мл каждая. Фильтруют через сухой фильтр, смешивают с 5 г безводного натрия сульфата, оставляют на 2 ч и фильтруют.

Готовят непосредственно перед использованием.

Хлороформ, стабилизированный амиленом.

Прозрачная, бесцветная жидкость.

Мало растворим в воде, смешивается со спиртом 96 %.

Вода. Не более 0,05 %.

Остаток после выпаривания. Не более 0,001 %.

Минимальное пропускание. Не менее 50 % при длине волны 255 нм; не менее 80 % при длине волны 260 нм; не менее 98 % при длине волны 300 нм.

Определение проводят, используя в качестве раствора сравнения воду.

Количественное определение. Не менее 99,8 % $CHCl_3$. Определение проводят методом газовой хроматографии.

Хлорпирифос. [2921-88-2]. $C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$. (М.м. 350,59).

O-(3,5,6-Трихлорпиридин-2-ил)-*O*,*O*-диэтилтиофосфат.

Температура кипения. Около 200 °С.

Температура плавления. От 42 до 44 °С.

Хлорплатиновая кислота. [18497-13-7]. $H_2[PtCl_6]\cdot 6H_2O$. (М.м. 517,9).

Гексахлорплатиновая(IV) кислота, гексагидрат.

Содержит не менее 37,0 % (м/м) Pt. (А.м. 195,1).

Кристаллы или кристаллическая масса коричневато-красного цвета.

Очень легко растворима в воде, растворима в спирте 96 %.

Количественное определение. 0,200 г хлорплатиновой кислоты прокаливают при температуре 900 °С до постоянной массы и взвешивают остаток (платина).

Хранят в защищенном от света месте.

3-Хлорпропан-1,2-диол. [96-24-2]. $C_3H_7ClO_2$. (М.м. 110,54).

3-Хлорпропан-1,2-диол.

Бесцветная жидкость.

Растворим в воде, спирте 96 % и эфире.

d_{20}^{20}. Около 1,322.

n_D^{20}. Около 1,480.

Температура кипения. Около 213 °С.

5-Хлорсалициловая кислота. [321-14-2]. $C_7H_5ClO_3$. (М.м. 172,57).

2-Гидрокси-5-хлорбензойная кислота.

Кристаллический порошок белого или почти белого цвета.

Растворима в метаноле.

Температура плавления. Около 173 °С.

Хлортриметилсилан. [75-77-4]. C_3H_9ClSi. (М.м. 108,64).

Триметилхлорсилан.

Прозрачная, бесцветная жидкость, дымящая на воздухе.

d_{20}^{20}. Около 0,86.

n_D^{20}. Около 1,388.

Температура кипения. Около 57 °С.

Хлоруксусная кислота. [79-11-8]. $C_2H_3ClO_2$. (М.м. 94,50).

Хлоруксусная кислота.

Бесцветные или белого цвета кристаллы, расплывающиеся на воздухе.

Очень легко растворима в воде, растворима в спирте 96 % и эфире.

Хранят в воздухонепроницаемой упаковке.

Хлорфенол. [106-48-9]. C_6H_5ClO. (М.м. 128,56).

4-Хлорфенол.

Бесцветные или почти бесцветные кристаллы.

Мало растворим в воде, очень легко растворим в спирте 96 %, эфире и растворах гидроксидов щелочных металлов.

Температура плавления. Около 42 °С.

2-Хлорэтанол. [107-07-3]. C_2H_5ClO. (М.м. 80,51).

2-Хлорэтан-1-ол.

Бесцветная жидкость.

Растворим в спирте 96 %.

d_{20}^{20}. Около 1,197.

n_D^{20}. Около 1,442.

Температура кипения. Около 130 °С.

Температура плавления. Около – 89 °С.

2-Хлорэтанола раствор.

125 мг 2-хлорэтанола растворяют в 2-пропаноле и доводят объём раствора тем же растворителем до 50 мл. 5 мл полученного раствора доводят 2-пропанолом до 50,0 мл.

(2-Хлорэтил)диэтиламина гидрохлорид. [869-24-9]. $C_6H_{14}ClN \cdot HCl$.
(М.м. 172,10).

2-Хлор-*N*,*N*-диэтилэтан-1-амина гидрохлорид.

Кристаллический порошок белого цвета.

Очень легко растворим в воде и метаноле, легко растворим в метиленхлориде, практически нерастворим в гексане.

Температура плавления. Около 211 °С.

Холина альфосцерат. См. **L-α-Глицерофосфорилхолин**.

Холина глицерофосфат. См. **L-α-Глицерофосфорилхолин**.

Холина хлорид. [67-48-1]. $C_5H_{14}ClNO$. (М.м. 139,62).

2-Гидрокси-*N*,*N*,*N*-триметилэтан-1-аминий хлорид.

Бесцветные кристаллы, расплывающиеся на воздухе.

Очень легко растворим в воде и спирте 96 %.

Хранят в воздухонепроницаемой упаковке.

Хрома(III) трихлорид гексагидрат. [10060-12-5]. $CrCl_3 \cdot 6H_2O$.

(М.м. 266,45). Хлорид хрома(III), гексагидрат.

Кристаллический порошок темно-зеленого цвета, гигроскопичен.

Легко растворим в воде и спирте 96 %.

Хранят в сухом месте, защищая от действия окислителей.

Хрома(VI) оксид. [1333-82-0]. CrO_3. (М.м. 99,99).

Оксид хрома(VI).

Игольчатые кристаллы или гранулы темного коричневато-красного цвета, расплывающиеся на воздухе.

Очень легко растворим в воде.

Хранят в воздухонепроницаемой упаковке.

Хрома(VI) оксида насыщенный раствор.

В 50 мл воды растворяют хрома(VI) оксид до появления твёрдого осадка. Срок годности раствора 1 месяц.

Хромазурол S. [1667-99-8]. $C_{23}H_{13}Cl_2Na_3O_9S$. (М.м. 605,3).

2-Гидрокси-5-[(2,6-дихлор-3-сульфонатофенил)(3-карбоксилато-5-метил-4-оксоциклогекса-2,5-диен-1-илиден)метил]-3-метилбензоат тринатрия.

Порошок коричневато-черного цвета.

Растворим в воде, мало растворим в спирте 96 %.

Хрома-калия сульфат. [7788-99-0]. $CrK(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$. (М.м. 499,4).

Дисульфат калия–хрома(III), додекагидрат.

Крупные кристаллы от фиолетово-красного до черного цвета.

Легко растворим в воде, практически нерастворим в спирте 96 %.

Хромовая кислота. [7738-94-5]. H_2CrO_4. (М.м. 118,01). Хромовая кислота.

40 г хромового ангидрида растворяют в воде и доводят объём раствора водой до 100,0 мл.

Хромовая смесь.

Насыщенный раствор хрома(VI) оксида в серной кислоте концентрированной.

Хромовый темно-синий. [1058-92-0]. $C_{16}H_9ClN_2Na_2O_9S_2$. (М.м. 518,8).

4,5-Дигидрокси-3-[(2-гидрокси-5-хлорфенил)диазенил]нафталин-2,7-дисульфонат динатрия.

Порошок темно-коричневого или черного цвета.

Легко растворим в воде.

0,05 % раствор вишнево-красного цвета. В интервале pH 9,5 – 10,0 имеет сине-фиолетовую окраску, его комплексы с ионами кальция, магния и цинка в тех же условиях красного цвета.

Переход окраски при прямом титровании от красной к сине-фиолетовой.

Индикаторная смесь.

0,25 г хромового темно-синего и 25 г натрия хлорида растирают в ступке и перемешивают.

Хромотроп II B. [548-80-1]. $C_{16}H_9N_3Na_2O_{10}S_2$. (М.м. 513,4). 4,5-Дигидрокси-3-[(4-нитрофенил)диазенил]нафталин-2,7-дисульфонат динатрия.

Порошок красновато-коричневого цвета.

Растворим в воде с образованием желтовато-красного раствора, практически нерастворим в спирте 96 %.

Хромотроп II B раствор 0,005 %. Раствор 0,05 г/л в серной кислоте концентрированной.

Хромотроповая кислота. [148-25-4]. $C_{10}H_8O_8S_2$. (М.м. 320,30).

4,5-Дигидрокси-2,7-нафталиндисульфоновая кислота.

Игольчатые кристаллы белого цвета.

Растворима в воде, очень мало растворима в спирте 96 % и эфире.

Температура плавления. Около 300 °С.

Хромотроповой кислоты раствор 0,5 %.

0,50 г хромотроповой кислоты растворяют примерно в 80 мл воды и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл.

Срок годности раствора 24 ч.

Хромотроповой кислоты натриевая соль. [5808-22-0]. $C_{10}H_6Na_2O_8S_2 \cdot 2H_2O$. (М.м. 400,3).

4,5-Дигидроксинафталин-2,7-дисульфонат динатрия, дигидрат.

Порошок желтовато-белого цвета.

Растворима в воде, практически нерастворима в спирте 96 %.

Хромотроповой кислоты натриевая соль безводная. [129-96-4]. $C_{10}H_6Na_2O_8S_2$. (М.м. 364,26).

4,5-Дигидроксинафталин-2,7-дисульфонат динатрия.

Порошок серовато-белого цвета.

Хромотроповой кислоты натриевой соли раствор 2,0 %.

2,0 г хромотроповой кислоты натриевой соли растворяют примерно в 80 мл воды и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл.

Цезия хлорид. [7647-17-8]. CsCl. (М.м. 168,36). Хлорид цезия.

Порошок белого цвета.

Очень легко растворим в воде, легко растворим в метаноле, практически нерастворим в ацетоне.

Целлюлоза для хроматографии (1). [9004-34-6].

Гомогенный порошок белого цвета со средним размером частиц менее 30 мкм.

Приготовление хроматографической пластинки. 15 % суспензию целлюлозы в воде гомогенизируют в электрическом миксере в течение 60 с и наносят на тщательно очищенные пластины слоем толщиной 0,1 мм с помощью устройства для нанесения покрытий. Сушат на воздухе.

Целлюлоза для хроматографии (2).

Микрокристаллическая целлюлоза. Гомогенный порошок белого цвета со средним размером частиц менее 30 мкм.

Приготовление хроматографической пластинки.

25 % суспензию целлюлозы в воде гомогенизируют в электрическом миксере в течение 60 с и наносят на тщательно очищенные пластины слоем толщиной 0,1 мм с помощью устройства для нанесения покрытий. Сушат на воздухе.

Целлюлоза для хроматографии F_{254}.

Микрокристаллическая целлюлоза F_{254}. Гомогенный порошок белого цвета со средним размером частиц менее 30 мкм, содержащий флуоресцентный

индикатор с оптимальной интенсивностью поглощения при длине волны 254 нм.

Приготовление хроматографической пластинки.

25 % суспензию целлюлозы в воде гомогенизируют в электрическом миксере в течение 60 с и наносят на тщательно очищенные пластины слоем толщиной 0,1 мм с помощью устройства для нанесения покрытий. Сушат на воздухе.

Церия(III) нитрат. [10294-41-4]. $Ce(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$. (М.м. 434,2).

Нитрат церия(III), гексагидрат.

Кристаллический порошок от бесцветного до слабо-желтого цвета.

Легко растворим в воде и спирте 96 %.

Церия аммония сульфат. См. **Аммония-церий(IV) сульфат**.

Церия(IV) сульфат. [10294-42-5]. $Ce(SO_4)_2 \cdot 4H_2O$. (М.м. 404,3). Сульфат церия(IV), тетрагидрат.

Кристаллический порошок или кристаллы желтого или оранжево-желтого цвета.

Очень мало растворим в воде, медленно растворим в разведённых растворах неорганических кислот.

Цетилтриметиламмония бромид. [57-09-0]. $C_{19}H_{42}BrN$. (М.м. 364,45). *N*,*N*,*N*-триметилгексадекан-1-аминий бромид.

Кристаллический порошок белого цвета.

Растворим воде, легко растворим в спирте 96 %.

Температура плавления. Около 240 °С.

Цефалина дигидрохлорид. [5853-29-2]. $C_{28}H_{38}N_2O_4 \cdot 2HCl$. (М.м. 539,53). (1*R*)-1-{[(2*S*,3*R*,11b*S*)-9,10-Диметокси-3-этил-1,3,4,6,7,11b-гексагидро-2*H*-пиридо[2,1-*a*]изохинолин-2-ил]метил}-7-метокси-1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-6-ола дигидрохлорид.

Кристаллический порошок от белого до желтоватого цвета. Легко растворим в воде, растворим в ацетоне и спирте 96 %.

$[\alpha]_D^{20}$. Около + 25° (2 % раствор).

Цианобромида раствор.

К бромной воде прибавляют по каплям при охлаждении 0,1 М раствор аммония тиоцианата до исчезновения желтой окраски.

Готовят непосредственно перед использованием.

Цианогуанидин. [461-58-5]. $C_2H_4N_4$. (М.м. 84,08).

N-Цианогуанидин.

Кристаллический порошок белого цвета.

Умеренно растворим в воде и спирте 96 %, практически нерастворим в эфире и метиленхлориде.

Температура плавления. Около 210 °С.

Цианоуксусная кислота. [372-09-8]. $C_3H_3NO_2$. (М.м. 85,06). Цианоуксусная кислота.

Гигроскопичные кристаллы белого или желтовато-белого цвета.

Растворима в воде.

Хранят в воздухонепроницаемой упаковке.

Циклогексан. [110-82-7]. C_6H_{12}. (М.м. 84,16). Циклогексан.

Прозрачная, бесцветная, воспламеняющаяся жидкость.

Практически нерастворим в воде, смешивается с органическими растворителями.

d_{20}^{20}. Около 0,78.

Температура кипения. Около 80,5 °С.

Циклогексан, используемый в спектрофотометрии, должен выдерживать следующее дополнительное испытание.

Минимальное пропускание. 45 % при длине волны 220 нм; 70 % при длине волны 235 нм; 90 % при длине волны 240 нм; 98 % при длине волны 250 нм.

Определение проводят, используя в качестве раствора сравнения воду.

Циклогексан особой чистоты.

Должен выдерживать требования для циклогексана и следующее дополнительное испытание.

Интенсивность поглощения, измеренная при длине волны 460 нм (при облучении пучком света с длиной волны 365 нм), не должна быть

интенсивнее поглощения раствора 0,002 ppm хинина в 0,05 М растворе серной кислоты.

Циклогексиламин. [108-91-8]. $C_6H_{13}N$. (М.м. 99,17). Циклогексанамин.

Бесцветная жидкость.

Растворим в воде, смешивается с наиболее распространенными растворителями.

n_D^{20}. Около 1,460.

Температура кипения. От 134 до 135 °С.

Циклогексилендинитрилтетрауксусная кислота. [125572-95-4]. $C_{14}H_{22}N_2O_8 \cdot H_2O$. (М.м. 364,35).

2,2',2",2"'-[*rac*-(1*R*,2*R*)-Циклогексан-1,2-диилди(нитрило)]тетрауксусная кислота, моногидрат.

Кристаллический порошок белого цвета.

Температура плавления. Около 204 °С.

Циклогексилметанол. [100-49-2]. $C_7H_{14}O$. (М.м. 114,19).

Циклогексилметанол.

Бесцветная жидкость со слабым запахом камфоры, растворим в этаноле.

n_D^{25}. Около 1,464

Температура кипения. Около 185 °С.

3-Циклогексилпропионовая кислота. [701-97-3]. $C_9H_{16}O_2$. (М.м. 156,22).

3-Циклогексилпропановая кислота.

Бесцветная жидкость.

d_{20}^{20}. Около 0,998.

n_D^{20}. Около 1,4648.

Температура кипения. Около 130 °С.

Цинеол. [470-82-6]. $C_{10}H_{18}O$. (М.м. 154,25). 1-Метил-4-(пропан-2-ил)-7-оксабицикло[2.2.1]гептан.

Бесцветная жидкость.

Практически нерастворим в воде, смешивается с этанолом и эфиром.

d_{20}^{20}. От 0,922 до 0,927.

n_D^{20}. От 1,456 до 1,459.

Температура затвердевания. От 0 до 1 °С.

Температурные пределы перегонки. От 174 до 177 °С.

Цинк. [7440-66-6]. Zn. (А.м. 65,38). Цинк.

Содержит не менее 99,5 % Zn.

Цилиндры или гранулы, или шарики серебристо-белого цвета, или стружка с синим блеском.

Цинк активированный.

Цинк в виде цилиндров или шариков помещают в коническую колбу, прибавляют достаточное количество раствора хлорплатиновой кислоты (50 ppm), чтобы полностью покрыть металл, через 10 мин металл промывают водой, удаляют воду и немедленно сушат.

Цинка ацетат. [5970-45-6]. $C_4H_6O_4Zn \cdot 2H_2O$. (М.м. 219,51).

Ацетат цинка, дигидрат.

Блестящие кристаллы белого цвета, слегка выветривающиеся на воздухе. Легко растворим в воде, растворим в спирте 96 %.

При температуре 100 °С теряет кристаллизационную воду.

d_{20}^{20}. Около 1,735.

Температура плавления. Около 237 °С.

Цинка ацетата раствор.

54,9 г цинка ацетата растворяют при перемешивании в смеси 600 мл воды и 150 мл уксусной кислоты ледяной. При перемешивании прибавляют 150 мл раствора аммиака концентрированного 32 %, охлаждают до комнатной температуры и доводят pH до 6,4 25 % раствором аммиака, доводят объём раствора водой до 1000,0 мл.

Цинка оксид. [1314-13-2]. ZnO. (М.м. 81,38). Оксид цинка.

Белый или белый с желтоватым оттенком аморфный порошок. Поглощает диоксид углерода из воздуха.

Практически нерастворим в воде, спирте 96 %; реагирует с неорганическими кислотами, разведёнными растворами гидроксидов щелочных металлов.

Цинка порошок.

Содержит не менее 90,0 % Zn. (А.м. 65,38).

Очень мелкий порошок серого цвета.

Растворим в хлористоводородной кислоте разведённой 7,3 %.

Цинка сульфат. [7446-20-0]. $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$. (М.м. 287,55).

Сульфат цинка, гептагидрат.

Бесцветные прозрачные кристаллы или мелкокристаллический порошок. На воздухе выветривается.

Очень легко растворим в воде, очень мало растворим в спирте 96 %.

Цинка сульфата раствор 1 %.

1,0 г цинка сульфата растворяют в воде и доводят объём раствора водой до 100 мл.

Цинка хлорид. [7646-85-7]. $ZnCl_2$. (М.м. 136,29).

Хлорид цинка.

Белый кристаллический порошок или белые брусочки.

Очень легко растворим в воде, растворим в спирте 96 % и глицерине.

Цинка хлорида раствор в муравьиной кислоте.

20 г цинка хлорида растворяют в 80 г 85 % раствора муравьиной кислоты безводной.

Цинка хлорида раствор йодированный.

20 г цинка хлорида и 6,5 г калия йодида растворяют в 10,5 мл воды, прибавляют 0,5 г йода и встряхивают в течение 15 мин. Если необходимо, фильтруют.

Хранят в защищенном от света месте.

Цинковая пыль. См. **Цинка порошок**.

Цинхонидин. [485-71-2]. $C_{19}H_{22}N_2O$. (М.м. 294,39).

(*R*)-(Хинолин-4-ил)[(1*S*,2*S*,4*S*,5*R*)-5-этенил-1-азабицикло[2.2.2]октан-2-ил]метанол.

Кристаллический порошок белого цвета.

Очень мало растворим в воде и петролейном эфире, умеренно растворим в спирте 96 %, мало растворим в эфире.

$[\alpha]_D^{20}$. От – 105° до – 110° (5 % раствор в спирте 96 %).

Температура плавления. Около 208 °С с разложением.

Хранят в защищенном от света месте.

Цинхонин. [118-10-5]. $C_{19}H_{22}N_2O$. (М.м. 294,39).

(*S*)-(Хинолин-4-ил)[(1*S*,2*S*,4*S*,5*R*)-5-этенил-1-азабицикло[2.2.2]октан-2-ил]метанол.

Кристаллический порошок белого цвета.

Мало растворим в воде, умеренно растворим в спирте 96 % и метаноле, мало растворим в эфире.

$[\alpha]_D^{20}$. От + 225° до + 230° (5 % раствор в спирте 96 %).

Температура плавления. Около 263 °С.

Хранят в защищенном от света месте.

Цирконила нитрат. [14985-18-3]. $ZrO(NO_3)_2 \cdot xH_2O$. (М.м. 231,23 для безводного).

Динитрат оксидоциркония(IV), гидрат.

Кристаллический порошок или кристаллы белого цвета. Гигроскопичен.

Растворим в воде. Водный раствор прозрачный или слегка опалесцирующий.

Хранят в воздухонепроницаемой упаковке.

Цирконила нитрата раствор 0,1 %.

Раствор 1 г/л в смеси растворителей вода – хлористоводородная кислота концентрированная 40:60.

Цирконила хлорид. [15461-27-5]. $ZrOCl_2 \cdot xH_2O$. (М.м. 178,13 для безводного).

Дихлорид оксидоциркония(IV), гидрат.

Кристаллический порошок или кристаллы белого или почти белого цвета. Легко растворим в воде и спирте 96 %.

Цирконила хлорид октагидрат. [13520-92-8]. $ZrCl_2O \cdot 8H_2O$. (М.м. 322,25).

Дихлорид оксидоциркония(IV), октагидрат.

Содержит не менее 96,0 % $ZrCl_2O \cdot 8H_2O$.

Кристаллический порошок или кристаллы белого или почти белого цвета.

Легко растворим в воде и спирте 96 %.

L-Цистеин. [52-90-4]. $C_3H_7NO_2S$. (М.м. 121,16). (2*R*)-2-Амино-3-сульфанилпропановая кислота.

Белый кристаллический порошок.

Легко растворим в воде, спирте 96 % и кислоте уксусной, практически нерастворим в ацетоне.

$[\alpha]_D^{20}$. Около 6,5° (10 % раствор в 1 М растворе хлористоводородной кислоты).

L-Цистин. [56-89-3]. $C_6H_{12}N_2O_4S_2$. (М.м. 240,30). (2*R*,2'*R*)-3,3'-Дисульфандиилбис(2-аминопропановая кислота).

Кристаллический порошок белого цвета. Разлагается при температуре 250 °С.

Практически нерастворим в воде и спирте 96 %, растворяется в разведённых растворах гидроксидов щелочных металлов.

$[\alpha]_D^{20}$. От – 218° до – 224° (1 М раствор хлористоводородной кислоты).

Цитраль. [5392-40-5]. $C_{10}H_{16}O$. (М.м. 152,23). (2*ZE*)-3,7-Диметилокта-2,6-диеналь.

Жидкость светло-желтого цвета.

Практически нерастворима в воде, смешивается со спиртом 96 %, эфиром и глицерином.

Цитроптен. [487-06-9]. $C_{11}H_{10}O_4$. (М.м. 206,19).

5,7-Диметокси-2*H*-1-бензопиран-2-он.

Игольчатые кристаллы.

Практически нерастворим в воде, эфире и петролейном эфире, легко растворим в ацетоне и спирте 96 %.

Температура плавления. Около 145 °С.

Черной туши раствор. Жидкую черную тушь разводят водой в соотношении 1:10.

Черырёххлористый углерод. [56-23-5]. CCl_4. (М.м. 153,82). Тетрахлорметан.

Прозрачная, бесцветная жидкость.

Практически нерастворим в воде, смешивается со спиртом 96 %.

d_{20}^{20}. От 1,595 до 1,598.

Температура кипения. От 76 до 77 °С.

Щавелевая кислота. [6153-56-6]. $C_2H_2O_4 \cdot 2H_2O$. (М.м. 126,07).

Щавелевая кислота, дигидрат.

Кристаллы белого цвета.

Растворима в воде, легко растворима в спирте 96 %.

Щавелевой кислоты раствор 5 %.

5 г щавелевой кислоты растворяют в воде и доводят объём раствора водой до 100 мл.

Щавелевой кислоты раствор 0,5 М

6,3 г щавелевой кислоты растворяют в воде и доводят объём раствора водой до 100 мл.

Щавелевой кислоты раствор в серной кислоте.

5 г щавелевой кислоты растворяют в охлажденной смеси 75 мл воды и 50 мл серной кислоты концентрированной.

Щелочно-аммиачный раствор. 50,0 г натрия гидроксида растворяют при перемешивании в 870 мл воды. После охлаждения к раствору прибавляют 80 мл аммиака водного и доводят объём раствора водой до метки.

Срок годности раствора 1 сут.

Эвгенол. [97-53-0]. $C_{10}H_{12}O_2$. (М.м. 164,20).

2-Метокси-4-(проп-2-ен-1-ил)фенол.

Бесцветная или бледно-желтого цвета маслянистая жидкость; под действием воздуха и света темнеет и становится более вязкой.

Практически нерастворим в воде, смешивается со спиртом 96 %, эфиром и жирными и эфирными маслами.

d_{20}^{20}. Около 1,07.

Температура кипения. Около 250 °С.

Хроматографическая чистота эвгенола, используемого в газовой хроматографии, должна быть не менее 98,0 %.

Хранят в защищенном от света месте.

ЭДТА. См. **(Этилендинитрил)тетрауксусная кислота**.

Эйконоген. [5639-34-9]. $C_{10}H_9NO_4S$. (М.м. 239,25).

61-Амино-5-гидроксинафталин-2-сульфоновая кислота.

Бесцветные кристаллы. Растворим в воде.

Эмодин. [518-82-1]. $C_{15}H_{10}O_5$. (М.м. 270,24).

1,3,8-Тригидрокси-6-метилантрацен-9,10-дион.

Игольчатые кристаллы оранжево-красного цвета.

Практически нерастворим в воде, мало растворим в эфире, растворим в спирте 96 % и растворах гидроксидов щелочных металлов.

Эозин натрий водорастворимый. См. **Эозин Н**.

Эозин Н. [17372-87-1]. $C_{20}H_6Br_4Na_2O_5$. (М.м. 691,9).

2-(2,4,5,7-Тетрабром-6-оксидо-3-оксо-3*H*-ксантен-9-ил)бензоат динатрия.

Порошок красного или коричневого цвета.

Легко растворим в воде.

Растворы индикатора. 0,1 % раствор, 0,5 % раствор.

Эриохром чёрный Т. [1787-61-7]. $C_{20}H_{12}N_3NaO_7S$. (М.м. 461,4).

3-Гидрокси-4-[(1-гидроксинафталин-2-ил)диазенил]-7-нитронафталин-1-сульфонат натрия.

Порошок коричневато-черного цвета.

Растворим в спирте 96 %, мало растворим в воде. Ядовит.

В интервале pH 9,5 – 10,0 имеет синюю окраску, а его комплексы с ионами кальция, магния и цинка в тех же условиях красно-фиолетового цвета.

Переход окраски при прямом титровании от красно-фиолетовой к синей.

Индикаторная смесь. 0,25 г индикатора и 25 г натрия хлорида растирают в ступке и перемешивают.

Испытание на чувствительность. 50 мг индикаторной смеси растворяют в 100 мл воды; появляется коричневато-фиолетовое окрашивание, которое должно перейти в синее при прибавлении 0,3 мл 10 % раствора аммиака разведённого. При последующем прибавлении 0,1 мл 1 % раствора магния сульфата окраска должна измениться на фиолетовую.

Раствор индикатора. 0,2 % раствор индикаторной смеси в спирте 95 %.

Хранят в воздухонепроницаемой упаковке, в защищенном от света месте.

Эритритол. [149-32-6]. $C_4H_{10}O_4$. (М.м. 122,12).

(2*R*,3*S*)-Бутан-1,2,3,4-тетраол.

Бесцветные кристаллы в виде тетрагональных призм.

Очень легко растворим в воде, растворим в пиридине, мало растворим в спирте 96 %.

Температура плавления. Около 121,5 °С.

Эрукамид. [112-84-5]. $C_{22}H_{43}NO$. (М.м. 337,58).

(13*Z*)-Докоз-13-енамид.

Порошок или гранулы желтоватого или белого цвета.

Практически нерастворим в воде, очень легко растворим в метиленхлориде, растворим в этаноле.

Температура плавления. Около 70 °С.

Эскулин. [531-75-9]. $C_{15}H_{16}O_9 \cdot xH_2O$. (М.м. 340,28 для безводного).

7-Гидрокси-6-(β-D-глюкопиранозилокси)-2*H*-1-бензопиран-2-он, гидрат.

Порошок белого или почти белого цвета или бесцветные кристаллы.

Умеренно растворим в воде и спирте 96 %, легко растворим в горячей воде и горячем спирте 96 %.

Эстрагол. [140-67-0]. $C_{10}H_{12}O$. (М.м. 148,20).

1-Метокси-4-(проп-2-ен-1-ил)бензол.

Маслянистая жидкость.

Смешивается со спиртом 96 %.

n_D^{20}. Около 1,52.

Температура кипения. Около 216 °С.

Хроматографическая чистота эстрагола, используемого в газовой хроматографии, должна быть не менее 98,0 %.

17α-Эстрадиол. [57-91-0]. $C_{18}H_{24}O_2$. (М.м. 272,38).

Эстра-1,3,5(10)-триен-3,17α-диол.

Кристаллический порошок белого или почти белого цвета или бесцветные кристаллы.

Практически нерастворим в воде, растворим в бензоле, умеренно растворим в спирте 96 %, мало растворим в эфире.

Температура плавления. От 178 до 179 °С.

Эсцин. [6805-41-0].

Смесь родственных сапонинов, полученных из семян *Aesculus hippocastanum* L.

Очень мелкий аморфный порошок почти белого или слегка красноватого или желтоватого цвета.

Этанол. [64-17-5]. C_2H_6O. (М.м. 46,07).

Этанол.

Спирт этиловый абсолютированный.

Бесцветная, прозрачная, летучая, воспламеняющаяся жидкость. Гигроскопичен.

Смешивается с водой и метиленхлоридом.

Горит голубоватым бесцветным пламенем.

Содержание этилового спирта не менее 99,8 % по объёму.

Хранят в стеклянных банках с притертыми пробками.

Этанол 95 %. См. **Спирт 95 %**.

Этанол 96 %. См. **Спирт 96 %**.

Этанол безводный. См. **Этанол**.

Этаноламин. [141-43-5]. C_2H_7NO. (М.м. 61,08).

2-Аминоэтан-1-ол.

Прозрачная, бесцветная, вязкая, гигроскопичная жидкость.

Смешивается с водой и метанолом, умеренно растворим в эфире.

d_{20}^{20}. Около 1,04.

n_D^{20}. Около 1,454.

Температура плавления. Около 11 °С.

Хранят в воздухонепроницаемой упаковке.

Этилакрилат. [140-88-5]. $C_5H_8O_2$. (М.м. 100,12).

Этил(проп-2-еноат).

Бесцветная жидкость.

Очень мало растворим в воде, смешивается с этанолом и эфиром.

d_{20}^{20}. Около 0,924.

n_D^{20}. Около 1,406.

Температура кипения. Около 99 °С.

Температура плавления. Около – 71 °С.

Этилацетат. [141-78-6]. $C_4H_8O_2$. (М.м. 88,11).

Этилацетат.

Прозрачная, бесцветная жидкость.

Растворим в воде, смешивается со спиртом 96 %.

d_{20}^{20}. От 0,901 до 0,904.

Температура кипения. От 76 до 78 °С.

Этилацетат обработанный.

200 г сульфаминовой кислоты диспергируют в этилацетате и доводят тем же растворителем до 1000,0 мл. Полученную суспензию перемешивают в течение 3 сут. и фильтруют через бумажный фильтр.

Срок годности 1 мес.

Этилбензол. [100-41-4]. C_8H_{10}. (М.м. 106,17).

Этилбензол.

Содержит не менее 99,5 % (м/м) C_8H_{10}.

Прозрачная, бесцветная жидкость.

Практически нерастворим в воде, растворим в ацетоне и спирте 96 %.

d_{20}^{20}. Около 0,87.

n_D^{20}. Около 1,496.

Температура кипения. Около 135 °С.

2-Этилгексан-1,3-диол. [94-96-2]. $C_8H_{18}O_2$. (М.м. 146,23).

2-Этилгексан-1,3-диол.

Слегка маслянистая бесцветная жидкость.

Растворим в этаноле, 2-пропаноле, пропиленгликоле и масле касторовом.

d_{20}^{20}. Около 0,942.

n_D^{20}. Около 1,451.

Температура кипения. Около 244 °С.

2-Этилгексановая кислота. [149-57-5]. $C_8H_{16}O_2$. (М.м. 144,21).

2-Этилгексановая кислота.

Бесцветная жидкость.

Практически нерастворима в воде, легко растворима в этаноле и эфире.

d_{20}^{20}. Около 0,91.

n_D^{20}. Около 1,425.

Температура кипения. Около 168 °С.

Этиленбис[3,3-ди(3-(1,1-диметилэтил)-4-гидроксифенил)бутират].

[32509-66-3]. $C_{50}H_{66}O_8$. (М.м. 795,1).

(Этан-1,2-диил)бис[3,3-бис(3-*трет*-бутил-4-гидроксифенил)бутаноат].

Кристаллический порошок.

Практически нерастворим в воде и петролейном эфире, очень легко растворим в ацетоне, эфире и метаноле.

Температура плавления. Около 165 °С.

Этиленгликоль. [107-21-1]. $C_2H_6O_2$. (М.м. 62,07).

Этан-1,2-диол.

Бесцветная, слегка вязкая гигроскопичная жидкость.

Смешивается с водой и спиртом 96 %, мало растворим в эфире.

d_{20}^{20}. От 1,113 до 1,115.

n_D^{20}. Около 1,432.

Температура плавления. Около – 12 °С.

Температура кипения. Около 198 °С.

Кислотность. К 10 мл прибавляют 20 мл воды и 1 мл 0,1 % раствора фенолфталеина; окраска раствора должна измениться до розовой при прибавлении не более 0,15 мл 0,02 М раствора натрия гидроксида.

Вода. Не более 0,2 %.

Этиленгликоля монометиловый эфир. [109-86-4]. $C_3H_8O_2$. (М.м. 76,09).

2-Метоксиэтан-1-ол.

Прозрачная, бесцветная жидкость.

Смешивается с водой, ацетоном, спиртом 96 % и эфиром.

d_{20}^{20}. Около 0,97.

n_D^{20}. Около 1,403.

Температура кипения. Около 125 °С.

Этиленгликоля моноэтиловый эфир. [110-80-5]. $C_4H_{10}O_2$. (М.м. 90,12).

2-Этоксиэтан-1-ол.

Прозрачная, бесцветная жидкость.

Смешивается с водой, ацетоном, спиртом 96 % и эфиром.

d_{20}^{20}. Около 0,93.

n_D^{20}. Около 1,406.

Температура кипения. Около 135 °С.

Этилендиамин. [107-15-3]. $C_2H_8N_2$. (М.м. 60,10). Этан-1,2-диамин.

Прозрачная, бесцветная жидкость с аммиачным запахом; имеет сильнощелочную реакцию.

Смешивается с водой и спиртом 96 %, мало растворим в эфире.

Температура кипения. Около 116 °С.

(Этилендинитрил)тетрауксусная кислота. [60-00-4]. $C_{10}H_{16}N_2O_8$.

(М.м. 292,24).

2,2',2",2"'-[Этан-1,2-диилди(нитрило)]тетрауксусная кислота.

Кристаллический порошок белого цвета.

Очень мало растворима в воде.

Температура плавления. Около 250 °С с разложением.

Этиленоксид. [75-21-8]. C_2H_4O. (М.м. 44,05). Оксиран.

Бесцветный, воспламеняющийся газ.

Очень легко растворим в воде и этаноле.

Температура ожижения. Около 12 °С.

Этиленоксида исходный раствор.

Все операции, производимые в ходе приготовления растворов, выполняют в вытяжном шкафу. Защищают руки и лицо, надевая полиэтиленовые защитные перчатки и подходящую маску для лица.

Растворы хранят в воздухонепроницаемой упаковке, в холодильнике при температуре от 4 до 8 °С. Все испытания проводят 3 раза.

В сухую чистую тест-пробирку, охлажденную в смеси из 1 части натрия хлорида и 3 частей измельченного льда, медленно вводят ток газообразного этиленоксида, позволяя конденсироваться на внутренней стенке тест-пробирки. С помощью стеклянного шприца, предварительно охлажденного до температуры 10 °С, помещают около 300 мкл (что соответствует приблизительно 0,25 г этиленоксида) жидкого этиленоксида в 50 мл макрогола 200 (особой чистоты). Определяют абсорбированное количество этиленоксида взвешиванием до и после абсорбции ($M_{со}$). Разводят этим же макроголом 200 до 100,0 мл. Перед использованием тщательно перемешивают.

Количественное определение. К 10 мл суспензии 500 г/л магния хлорида в этаноле прибавляют 20,0 мл 0,1 М раствора хлористоводородной кислоты в спирте. Колбу закрывают пробкой, взбалтывают до получения насыщенного раствора и для достижения равновесия выдерживают в течение ночи. 5,00 г исходного раствора 2,5 г/л этиленоксида помещают в колбу, взвешивают, выдерживают в течение 30 мин и титруют потенциометрически 0,1 М спиртовым раствором калия гидроксида.

Проводят контрольный опыт, используя вместо исходного раствора этиленоксида такое же количество макрогола 200 (особой чистоты).

Содержание этиленоксида (X) в миллиграммах в 1 г вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(V_0 - V_1) \cdot f \cdot 4{,}404}{m},$$

где V_0 – объём 0,1 М спиртового раствора калия гидроксида, израсходованный на титрование контрольного раствора;

V_1 объём 0,1 М спиртового раствора калия гидроксида, израсходованный на титрование испытуемого раствора;

f – поправочный коэффициент к молярности 0,1 М спиртового раствора калия гидроксида;

m – масса испытуемого образца, г.

Этиленоксида раствор 0,001 %. 1,0 г холодного исходного раствора этиленоксида (соответствует 2,5 мг этиленоксида) помещают в холодную ёмкость, содержащую 40,0 г холодного макрогола 200 очищенного. Перемешивают, определяют точную массу и разбавляют до расчётной массы для получения раствора, содержащего 50 мкг этиленоксида на 1 грамм раствора. 10,0 г полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, содержащую около 30 мл воды, перемешивают и доводят объём раствора водой до 50,0 мл (10 мкг/мл этиленоксида). Используют свежеприготовленным.

Этиленоксида раствор 0,0002 %. 10,0 мл этиленоксида раствора 0,001 % помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят объём раствора водой до метки (2 мкг/мл этиленоксида). Используют свежеприготовленным.

Этиленхлоргидрин. См. **2-Хлорэтанол**.

1,1′-Этилиденбис(триптофан). [132685-02-0]. $C_{24}H_{26}N_4O_4$. (М.м. 434,5). (2*S*,2'*S*)-3,3'-[Этан-1,1-диилбис(1*H*-индол-1,3-диил)]бис(2-аминопропановая кислота).

Содержит не менее 98,0 % $C_{24}H_{26}N_4O_4$.

Кристаллический порошок белого или почти белого цвета.

Мало растворим в воде, очень мало растворим в спирте 96 %, практически нерастворим в эфире.

Температура плавления. Около 223 °С с разложением.

***N*-Этилмалеимид**. [128-53-0]. $C_6H_7NO_2$. (М.м. 125,13).

1-Этил-1*H*-пиррол-2,5-дион.

Бесцветные кристаллы.

Умеренно растворим в воде, легко растворим в спирте 96 %.

Температура плавления. От 41 до 45 °С.

Хранят при температуре от 2 до 8 °С.

Этилметилкетон. См. **Метилэтилкетон**.

2-Этил-2-метилянтарная кислота. [631-31-2]. $C_7H_{12}O_4$. (М.м. 160,17).

(2*RS*)-2-Метил-2-этилбутандиовая кислота.

Температура плавления. От 104 до 107 °С.

Этилпарагидроксибензоат. [120-47-8]. $C_9H_{10}O_3$. (М.м. 166,17).

Этил(4-гидроксибензоат).

Белый кристаллический порошок или бесцветные кристаллы.

Очень мало растворим в воде, легко растворим в спирте 96 %.

Температура плавления. От 115 до 118 °С.

Этилформиат. [109-94-4]. $C_3H_6O_2$. (М.м. 74,08). Этилформиат.

Прозрачная, бесцветная воспламеняющаяся жидкость.

Легко растворим в воде, смешивается со спиртом 96 % и эфиром.

d_{20}^{20}. Около 0,919.

n_D^{20}. Около 1,36.

Температура кипения. Около 54 °С.

Этилцианоацетат. [105-56-6]. $C_5H_7NO_2$. (М.м. 113,11). Этил(цианоацетат).

Бесцветная или светло-желтого цвета жидкость.

Мало растворим в воде, смешивается со спиртом 96 % и эфиром.

Температура кипения. От 205 до 209 °С с разложением.

Этинилфенилацетамид. [70933-58-3]. $C_{10}H_9NO$. (М.м. 159,18).

N-(3-Этинилфенил)ацетамид.

Содержит не менее 98,0 % $C_{10}H_9NO$.

Хранить при температуре 2–8 °С.

Этоксихризоидина гидрохлорид. [2313-87-3]. $C_{14}H_{16}N_4O \cdot HCl$. (М.м. 292,76).

4-[(4-Этоксифенил)диазенил]бензол-1,3-диамина гидрохлорид.

Порошок красноватого цвета.

Растворим в спирте 96 %.

Этоксихризоидина раствор 0,1 %. Раствор 1 г/л в спирте 96 %.

Испытание на чувствительность. К смеси 5 мл хлористоводородной кислоты разведённой 7,3 % и 0,05 мл раствора этоксихризоидина прибавляют 0,05 мл 0,0167 М раствора бромид-бромата. Окраска раствора должна измениться от красной до светло-желтой в течение 2 мин.

Эфир. [60-29-7]. $C_4H_{10}O$. (М.м. 74,12). 1,1'-Оксидиэтан.

Прозрачная, бесцветная, летучая, очень подвижная, легко воспламеняющаяся жидкость; гигроскопична.

Пары эфира с воздухом, кислородом и азота закисью образуют в определенных концентрациях взрывчатую смесь.

d_{20}^{20}. От 0,713 до 0,715.

Температура кипения. От 34 до 35 °С.

Не перегоняют, если эфир не выдерживает испытания на пероксиды.

Пероксиды. 8 мл раствора крахмала с калия йодидом помещают в цилиндр с притертой стеклянной пробкой вместимостью 12 мл и диаметром около 1,5 см. Объём цилиндра заполняют полностью испытуемым эфиром, перемешивают и выдерживают в темном месте в течение 30 мин; не должно появиться окрашивание.

Название и концентрация любого добавленного стабилизатора должны быть указаны на этикетке.

Хранят в воздухонепроницаемой упаковке, защищенном от света месте, при температуре не выше 15 °С.

Эфир диэтиловый. См. **Эфир**.

Эфир сухой.

Эфир промывают при встряхивании водой, затем насыщенным раствором кальция хлорида, выдерживают над безводным кальция хлоридом в течение не менее 24 ч, время от времени перемешивая, и фильтруют.

Янтарная кислота. [110-15-6]. $C_4H_6O_4$. (М.м. 118,09). Бутандиовая кислота.

Кристаллический порошок белого цвета или бесцветные кристаллы.

Растворима в воде и спирте 96 %.

Температура плавления. От 184 до 187 °С.

Титрованные растворы	**ОФС.1.3.0002.15**
	Взамен ГФ X
	Взамен ст. ГФ XI, вып. 1
	Взамен ГФ XII, 1ч., ОФС 42-0071-07

Титрованными растворами называются растворы точно известной концентрации, предназначенные для целей титриметрического анализа.

Концентрация титрованного раствора (титранта) обычно выражается его молярной концентрацией, титром или титром по определяемому веществу.

Молярная концентрация (молярность) – это выраженное в молях количество растворённого вещества, содержащееся в 1 л раствора. Молярность вычисляется как отношение количества растворенного вещества к объему раствора:

$$C_M = M/V,$$

где C_M – молярная концентрация, моль/л;

M — количество растворённого вещества, моль;

V — общий объём раствора, л.

Раствор, содержащий *x* моль вещества в 1 л раствора, обозначают *x* М раствором.

Титр – это выраженная в миллиграммах масса растворенного вещества, содержащаяся в 1 мл раствора (размерность – мг/мл).

Титр титранта по определяемому веществу – это выраженная в миллиграммах масса определяемого вещества, эквивалентная 1 мл данного

титранта. Титр титранта по определяемому веществу вычисляют, исходя из молярной концентрации или титра титранта с учётом стехиометрических коэффициентов уравнения химической реакции, протекающей при титровании, и молярных масс реагирующих веществ (размерность – мг/мл).

Иногда концентрацию раствора выражают числом грамм-эквивалентов вещества в 1 л раствора. Такие растворы называются нормальными и обозначаются символом «н.». Грамм-эквивалентом называется число граммов вещества, равное его эквиваленту. Эквивалент вещества – это такое количество вещества, которое может присоединять, высвобождать или другим способом быть эквивалентным катиону водорода в кислотно-основных (ионообменных) реакциях или электрону в окислительно-восстановительных реакциях. Величина эквивалентной массы вещества определяется исходя из его химической формулы, принадлежности к тому или иному классу химических соединений, а также химической реакции, протекающей между определяемым веществом и титрованным раствором.

Для приготовления титрованных растворов применяют химически чистые вещества или промышленного производства стандарт-титры для титриметрии. Допускается приготовление титрованного раствора несколько большей концентрации, чем требуется по расчету, который при необходимости можно довести до нужной концентрации путем разбавления.

Для приготовления титрованных растворов используют мерные ёмкости исключительно класса А.

Приготовленные титрованные растворы стандартизуют двумя способами: по стандартному титрованному раствору или по точной навеске соответствующего стандартного образца. Перед стандартизацией титрованный раствор необходимо тщательно перемешать. Концентрацию титрованных растворов определяют путем достаточного количества титрований (не менее трех).

При ручном титровании используют бюретки с ценой деления в пределах 0,01 – 0,05 мл.

Если титрованный раствор используют в количественном анализе, в котором конечную точку титрования определяют электрометрическим методом (например, методом амперометрии или потенциометрии), раствор стандартизуют тем же методом. Состав среды, в которой стандартизуют титрованный раствор, должен быть таким же, как и тот, в котором он будет использован.

Для определения точной концентрация приготовленного титрованного раствора вычисляют поправочный коэффициент (*K*), представляющий собой отношение фактически полученной концентрации титрованного раствора к теоретически заданной. Поправочный коэффициент рассчитывают с точностью до четвёртого знака после запятой.

Вычисление поправочного коэффициента производят одним из указанных ниже способов.

Способ 1 – по навеске соответствующего стандартного образца:

$$K = \frac{a}{T \cdot V},$$

где a – навеска вещества, по которому устанавливают титр, мг;
T – количество вещества, по которому устанавливается титр, соответствующее 1 мл раствора заданной молярной концентрации (титр титранта по определяемому веществу), мг/мл;
V – объем приготовленного раствора, израсходованный на титрование, мл.

Способ 2 – по титрованному раствору известной концентрации:

$$K = \frac{V_0 \cdot K_0}{V},$$

где V_0 – объем титрованного раствора, по которому устанавливается титр, мл;

V – объем приготовленного титрованного раствора, израсходованный на титрование, мл;

K_0 – поправочный коэффициент титрованного раствора, по которому устанавливается титр.

Коэффициент *К* должен находиться в пределах от 0,98 до 1,02. Если коэффициент *К* отличается от указанных пределов (более чем на ± 2 %), то раствор следует разбавить или укрепить на основании следующего расчета.

В случае разбавления раствора из величины *К* вычитают единицу и полученную разность умножают на 1000. Результат умножения соответствует количеству воды в миллилитрах, которое следует прибавить к каждому литру разбавляемого раствора. В случае укрепления из единицы вычитают коэффициент *К* и разность умножают на количество граммов исходного вещества, взятое для приготовления 1 л раствора. Полученное количество добавляют на каждый литр раствора. После этого раствор тщательно перемешивают.

Относительное стандартное отклонение при определении коэффициента *К* не должно превышать 0,2 %.

Титрованные растворы меньшей молярной концентрации можно приготовить посредством точного разведения более концентрированных титрованных растворов водой, свободной от углерода диоксида. Поправочные коэффициенты полученных разбавленных растворов такие же, как у исходных растворов. Исключение составляют титрованные растворы для окислительно-восстановительного титрования, которые после разбавления нуждаются в повторной установке титра. Методика установки титра должна быть приведена в фармакопейной статье.

Растворы с молярной концентрацией ниже 0,1 М готовят непосредственно перед использованием.

Так как при хранении концентрация титрованного раствора может изменяться, необходимо перепроверять поправочные коэффициенты титрованных растворов в соответствии с установленными для них сроками хранения.

Титрованные растворы, в которых при хранении появились хлопья или осадок, применять нельзя.

Титрованные растворы хранят при комнатной температуре, защищая их, при необходимости, от воздействия углерода диоксида, влаги воздуха и прямых солнечных лучей.

Рекомендуется готовить, стандартизовать и использовать титрованные растворы при одной и той же температуре.

Исходные стандартные вещества для титрованных растворов

Исходные стандартные вещества для установки концентрации титрованных растворов обозначают буквами РО (реактив основной) и готовят следующим образом.

Калия бромат РО. $KBrO_3$. (М.м. 167,00).

Калия бромат перекристаллизовывают из кипящей воды. Кристаллы собирают и сушат до постоянной массы при температуре 180 ºС.

Калия гидрофталат РО. $C_8H_5KO_4$. (М.м. 204,22).

Калия гидрофталат перекристаллизовывают из кипящей воды. Кристаллы собирают при температуре выше 35 ºС и сушат до постоянной массы при температуре 120 ºС.

Калия дихромат РО. $K_2Cr_2O_7$. (М.м. 294,19).

Калия дихромат перекристаллизовывают из горячей воды. Кристаллы сушат до постоянной массы при температуре от 130 до 150 °С и растирают.

Кислота бензойная РО. $C_7H_6O_2$. (М.м. 122,12).

Кислоту бензойную сублимируют.

Мышьяка оксид РО. As_2O_3. (М.м. 197,84).

Мышьяка оксид сублимируют**.**

Хранят над силикагелем безводным.

Натрия карбонат безводный РО. Na_2CO_3. (М.м. 106,01).

Насыщенный раствор натрия карбоната фильтруют при комнатной температуре. Через фильтрат медленно пропускают поток углерода диоксида при постоянном охлаждении и перемешивании. Через 2 ч осадок собирают на стеклянном фильтре, промывают фильтр ледяной водой, насыщенной углерода диоксидом. Сушат при температуре от 100 до 105 ºС и прокаливают

до постоянной массы при температуре от 270 до 300 ºС, периодически перемешивая.

Натрия хлорид РО. NaCl. (М.м. 58,44).

К 1 объёму насыщенного раствора натрия хлорида прибавляют 2 объема хлористоводородной кислоты концентрированной. Полученные кристаллы собирают и промывают хлористоводородной кислотой 25 %, которую удаляют нагреванием на кипящей водяной бане. Прокаливают до постоянной массы при температуре 300 ºС.

Сульфаниловая кислота РО. $C_6H_7NO_3S$. (М.м. 173,19).

Сульфаниловую кислоту перекристаллизовывают из кипящей воды, фильтруют и сушат до постоянной массы при температуре от 100 до 105 ºС.

Цинк РО. Zn. (А.м. 65,37).

Используют цинк с содержанием не менее 99,9 % Zn.

Титрованные растворы

1 М раствор азотной кислоты.

96,9 мл азотной кислоты концентрированной доводят водой до объёма 1000,0 мл.

Установка титра. 1,000 г натрия карбоната безводного РО растворяют в 50 мл воды, прибавляют 0,1 мл 0,1 % раствора метилового оранжевого и титруют приготовленным раствором азотной кислоты до красновато-жёлтого окрашивания; кипятят в течение 2 мин, раствор снова приобретает жёлтую окраску, охлаждают и продолжают титрование до красновато-жёлтого окрашивания.

1 мл 1 М раствора азотной кислоты соответствует 53,00 мг Na_2CO_3.

0,1 М раствор аммония тиоцианата. 0,1 М раствор аммония роданида.

7,612 г аммония тиоцианата растворяют в воде и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл.

Установка титра. К 20,0 мл 0,1 М раствора серебра нитрата прибавляют 25 мл воды, 2 мл 2 М раствора азотной кислоты, 2 мл 10 % раствора железа

аммония сульфата и титруют приготовленным раствором аммония тиоцианата до появления красновато-желтого окрашивания.

1 мл 0,1 М раствора серебра нитрата соответствует 7,612 мг NH_4SCN.

0,01 М раствор аммония тиоцианата. 0,01 М раствор аммония роданида.

100,0 мл 0,1 М раствора аммония тиоцианата разбавляют водой до объёма 1000,0 мл.

Установка титра. К 20,0 мл 0,01 М раствора серебра нитрата прибавляют 25 мл воды, 2 мл 2 М раствора азотной кислоты, 2 мл 10 % раствора железа аммония сульфата и далее поступают, как указано при установке титра 0,1 М раствора аммония тиоцианата.

1 мл 0,01 М раствора серебра нитрата соответствует 0,7612 мг NH_4SCN.

0,1 М раствор аммония церия нитрата.

Раствор, содержащий 56 мл серной кислоты концентрированной и 54,82 г аммония церия нитрата, взбалтывают в течение 2 мин, прибавляют последовательно 5 порций, по 100 мл каждая, воды, перемешивая после каждого прибавления. Доводят объем раствора водой до 1000,0 мл. Титр полученного раствора устанавливают через 10 сут.

Установка титра. К 25,0 мл полученного раствора прибавляют 2 г калия йодида и 150 мл воды. Немедленно титруют 0,1 М раствором натрия тиосульфата, используя в качестве индикатора 1 мл 0,1 % раствора крахмала.

1 мл 0,1 М раствора натрия тиосульфата соответствует 54,82 мг $(NH_4)_2Ce(NO_3)_6$.

Хранят в защищенном от света месте.

0,01 М раствор аммония церия нитрата.

К 100,0 мл 0,1 М раствора аммония церия нитрата прибавляют при охлаждении 30 мл серной кислоты концентрированной и доводят объем раствора водой до 1000,0 мл.

0,1 М раствор аммония церия сульфата.

65,0 г аммония церия сульфата растворяют в смеси 500 мл воды и 30 мл серной кислоты концентрированной, охлаждают и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл.

Установка титра. К 25,0 мл полученного раствора прибавляют 2 г калия йодида и 150 мл воды. Немедленно титруют 0,1 М раствором натрия тиосульфата, используя в качестве индикатора 1 мл 0,1 % раствора крахмала.

1 мл 0,1 М раствора натрия тиосульфата соответствует 63,26 мг $2\ (NH_4)_2SO_4 \cdot Ce(SO_4)_2 \cdot 2\ H_2O$.

0,01 М раствор аммония церия сульфата.

К 100,0 мл 0,1 М раствора аммония церия сульфата прибавляют при охлаждении 30 мл серной кислоты концентрированной и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл.

0,05 М раствор бария перхлората.

15,8 г бария гидроксида растворяют в смеси 75 мл воды и 7,5 мл хлорной кислоты, доводят pH раствора до 3,0 хлорной кислотой и фильтруют, если необходимо. Прибавляют 150 мл спирта 96 %, доводят объём раствора водой до 250 мл, затем доводят объём раствора буферным раствором pH 3,7 до 1000,0 мл.

Установка титра. К 5,0 мл 0,05 М раствора серной кислоты прибавляют 5 мл воды, 50 мл буферного раствора pH 3,7 и 0,5 мл 0,1 % раствора ализарина S; титруют приготовленным раствором бария перхлората до появления оранжево-красного окрашивания. Определение титра проводят непосредственно перед использованием.

1 мл 0,05 М раствора серной кислоты соответствует 16,81 мг $Ba(ClO_4)_2$.

0,025 М раствор бария перхлората.

500,0 мл 0,05 М раствора бария перхлората доводят ацетатным буферным раствором pH 3,7 до объёма 1000,0 мл.

0,1 М раствор бария хлорида.

24,4 г бария хлорида растворяют в воде и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл.

Установка титра. К 10,0 мл приготовленного раствора бария хлорида прибавляют 60 мл воды, 3 мл аммиака раствора концентрированного 25 %, от 0,5 до 1,0 мг фталеинового пурпурного и титруют 0,1 М раствором натрия эдетата. Когда окраска раствора начнет ослабевать, прибавляют 50 мл спирта 96 % и продолжают титрование до исчезновения синевато-фиолетового окрашивания.

1 мл 0,1 М раствора натрия эдетата соответствует 24,43 мг $BaCl_2 \cdot 2 H_2O$.

0,004 М раствор бензэтония хлорида.

1,792 г бензэтония хлорида, предварительно высушенного до постоянной массы при температуре от 100 до 105 ºС, растворяют в воде и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл.

Установка титра. Вычисляют молярность раствора, исходя из содержания $C_{27}H_{42}ClNO_2$ в высушенном бензэтония хлориде, определенного следующим образом. 0,350 г высушенного вещества растворяют в 30 мл уксусной кислоты безводной, прибавляют 6 мл 3,19 % раствора ртути (II) ацетата и титруют 0,1 М раствором хлорной кислоты, используя в качестве индикатора 0,05 мл 0,5 % раствора кристаллического фиолетового. Параллельно проводят контрольный опыт.

1 мл 0,1 М раствора хлорной кислоты соответствует 44,81 мг $C_{27}H_{42}ClNO_2$.

0,0167 М (0,1 н.) раствор бромид-бромата. 0,05 М раствор брома.

2,7835 г калия бромата РО и 13 г калия бромида растворяют в воде и доводят объем раствора водой до 1000,0 мл.

0,1 М раствор железа(III) аммония сульфата.

50,0 г железа(III) аммония сульфата растворяют в смеси 300 мл воды и 6 мл серной кислоты концентрированной и доводят объем раствора водой до 1000,0 мл.

Установка титра. К 25,0 мл приготовленного раствора железа(III) аммония сульфата прибавляют 3 мл хлористоводородной кислоты

концентрированной, 2 г калия йодида и через 10 мин титруют 0,1 М раствором натрия тиосульфата, используя в качестве индикатора 1 мл 0,1 % раствора крахмала.

1 мл 0,1 М раствора натрия тиосульфата соответствует 48,22 мг $FeNH_4(SO_4)_2 \cdot 12\ H_2O$.

0,1 М раствор железа(II) сульфата.

27,80 г железа(II) сульфата растворяют в 500 мл серной кислоты разведенной 9,8 % и доводят объем раствора водой до 1000,0 мл.

Установка титра. К 25,0 мл приготовленного раствора железа(II) сульфата прибавляют 3 мл фосфорной кислоты концентрированной и тотчас титруют 0,02 М раствором калия перманганата. Определение титра проводят непосредственно перед использованием.

1 мл 0,02 М раствора калия перманганата соответствует 27,80 мг $FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$.

0,5 М (1 н.) раствор йода.

127,0 г йода и 200 г калия йодида растворяют в воде и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл.

Установка титра. К 2,0 мл полученного раствора прибавляют 1 мл 2 М раствора уксусной кислоты и 50 мл воды. Титруют 0,1 М раствором натрия тиосульфата, используя в качестве индикатора 1 мл 0,1% раствора крахмала.

1 мл 0,1 М раствора натрия тиосульфата соответствует 12,69 мг I_2.

Хранят в защищенном от света месте.

0,1 М (0,2 н.) раствор йода.

Около 25,5 г йода и 40 г калия йодида растворяют в воде и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл.

Установка титра. К 10,0 мл полученного раствора прибавляют 1 мл 2 М раствора уксусной кислоты и 40 мл воды. Далее поступают, как указано при установке титра 0,5 М раствора йода.

1 мл 0,1 М раствора натрия тиосульфата соответствует 12,69 мг I_2.

Хранят в защищенном от света месте.

0,05 М (0,1 н.) раствор йода.

20 г калия йодида растворяют в минимальном количестве воды, прибавляют 12,7 г йода, растворяют при перемешивании и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл.

Установка титра. К 20,0 мл полученного раствора прибавляют 1 мл 2 М раствора уксусной кислоты и 30 мл воды. Далее поступают, как указано при установке титра 0,5 М раствора йода.

1 мл 0,1 М раствора натрия тиосульфата соответствует 12,69 мг I_2.

Хранят в защищенном от света месте.

0,01 М (0,02 н.) раствор йода.

0,3 г калия йодида растворяют в 20,0 мл 0,05 М раствора йода и доводят объем раствора водой до 100,0 мл.

Установка титра. К 25,0 мл полученного раствора прибавляют 1 мл 2 М раствора уксусной кислоты и 25 мл воды и титруют 0,01 М раствором натрия тиосульфата, используя в качестве индикатора 1 мл 0,1 % раствора крахмала.

1 мл 0,01 М раствора натрия тиосульфата соответствует 1,269 мг I_2.

0,1 М раствор йода монохлорида (для определения йодного числа).

11,06 г калия йодида и 7,10 г калия йодата помещают в склянку с притертой пробкой, прибавляют 50 мл воды и 50 мл концентрированной хлористоводородной кислоты, закрывают пробкой и встряхивают до полного растворения образующегося при реакции йода. Раствор переносят в делительную воронку и взбалтывают с 10 мл хлороформа. Если хлороформный слой окрашивается в фиолетовый цвет, то прибавляют при сильном взбалтывании по каплям 1 % раствор калия йодата до обесцвечивания хлороформного слоя. Если же хлороформный слой остается бесцветным, то прибавляют по каплям 1 % раствор калия йодида до появления бледно-розовой окраски. После отстаивания водный слой сливают

в мерную колбу и доводят объем раствора водой до 1000,0 мл. Приготовленный раствор должен иметь лимонно-желтый цвет.

Установка титра. 25,0 мл приготовленного раствора йода монохлорида помещают в колбу с притертой пробкой, прибавляют 1 г калия йодида и оставляют в защищенном от света месте на 15 мин. Выделившийся йод титруют 0,1 М раствором натрия тиосульфата, используя в качестве индикатора

0,5 – 1 мл 1 % раствора крахмала.

1 мл 0,1 М раствора натрия тиосульфата соответствует 12,69 мг I_2.

Титр раствора устанавливают каждый раз перед применением.

Хранят в сосудах темного стекла с притертыми пробками в защищенном от света месте.

0,033 М (0,2 н.) раствор калия бромата.

5,5110 г калия бромата РО растворяют в воде и доводят объем раствора водой до 1000,0 мл.

Установка титра. К 10,0 мл полученного раствора прибавляют 50 мл воды, 10 мл 16,6 % раствора калия йодида и 5 мл 7 М раствора хлористоводородной кислоты. Титруют 0,1 М раствором натрия тиосульфата, используя в качестве индикатора 1 мл 0,1 % раствора крахмала. Индикатор прибавляют в конце титрования.

1 мл 0,1 М раствора натрия тиосульфата соответствует 2,783 мг $KBrO_3$.

0,02 М (0,12 н.) раствор калия бромата.

3,340 г калия бромата РО растворяют в воде и доводят объем раствора водой до 1000,0 мл.

Установка титра. К 15,0 мл полученного раствора прибавляют 45 мл воды. Далее поступают, как указано при установке титра 0,033 М раствора калия бромата.

1 мл 0,1 М раствора натрия тиосульфата соответствует 2,783 мг $KBrO_3$.

0,0167 М (0,1 н.) раствор калия бромата. 0,1 н. раствор калия бромата.

2,7889 г калия бромата РО растворяют в воде и доводят объем раствора водой до 1000,0 мл.

Установка титра. К 20,0 мл полученного раствора прибавляют 40 мл воды. Далее поступают, как указано при установке титра 0,033 М раствора калия бромата.

1 мл 0,1 М раствора натрия тиосульфата соответствует 2,783 мг $KBrO_3$.

0,0083 М (0,05 н.) раствор калия бромата.

250,0 мл 0,033 М раствора калия бромата доводят водой до объёма 1000,0 мл.

Установка титра. К 40,0 мл полученного раствора добавляют 20 мл воды. Далее поступают, как указано при установке титра 0,033 М раствора калия бромата.

1 мл 0,1 М раствора натрия тиосульфата соответствует 2,783 мг $KBrO_3$.

1 М раствор калия гидроксида.

60 г калия гидроксида растворяют в воде, свободной от углерода диоксида, и доводят объем раствора водой, свободной от углерода диоксида, до 1000,0 мл.

Установка титра. 20,0 мл приготовленного раствора калия гидроксида титруют 1 М раствором хлористоводородной кислоты, используя в качестве индикатора 0,5 мл 0,1 % раствора фенолфталеина.

1 мл 1 М раствора хлористоводородной кислоты соответствует 56,11 мг KOH.

0,1 М раствор калия гидроксида.

6 г калия гидроксида растворяют в воде, свободной от углерода диоксида, и доводят объем раствора тем же растворителем до 1000,0 мл.

Установка титра. 20,0 мл приготовленного раствора калия гидроксида титруют 0,1 М раствором хлористоводородной кислоты, используя в качестве индикатора 0,5 мл 0,1 % раствора фенолфталеина.

1 мл 0,1 М раствора хлористоводородной кислоты соответствует 5,611 мг KOH.

0,5 М раствор калия гидроксида в спирте 60 % (об/об).

3 г калия гидроксида растворяют в спирте 60 % (об/об), свободном от альдегидов, и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл.

Установка титра. 20,0 мл приготовленного раствора калия гидроксида в спирте 60 % (об/об) титруют 0,5 М раствором хлористоводородной кислоты, используя в качестве индикатора 0,5 мл 0,1 % раствора фенолфталеина.

1 мл 0,5 М раствора хлористоводородной кислоты соответствует 28,06 мг KOH.

0,5 М раствор калия гидроксида спиртовой. 0,5 М раствор кали едкого спиртовой.

3 г калия гидроксида растворяют в 5 мл воды и доводят объем раствора спиртом 96 %, свободным от альдегидов, до 100,0 мл.

Установка титра. 20,0 мл приготовленного раствора калия гидроксида спиртового титруют 0,5 М раствором хлористоводородной кислоты, используя в качестве индикатора 0,5 мл 0,1 % раствора фенолфталеина.

1 мл 0,5 М раствора хлористоводородной кислоты соответствует 28,06 мг KOH.

0,1 М раствор калия гидроксида спиртовой. 0,1 М раствор кали едкого спиртовоый.

20,0 мл 0,5 М раствора калия гидроксида спиртового доводят спиртом 96 %, свободным от альдегидов, до объёма 100,0 мл.

Установка титра. 20,0 мл полученного раствора титруют 0,1 М раствором хлористоводородной кислоты, используя в качестве индикатора 0,5 мл 0,1 % раствора фенолфталеина.

1 мл 0,1 М раствора хлористоводородной кислоты соответствует 5,611 мг KOH.

0,01 М раствор калия гидроксида спиртовой.

2,0 мл 0,5 М раствора калия гидроксида спиртового доводят спиртом 96 %, свободным от альдегидов, до объёма 100,0 мл.

0,1 М раствор калия гидрофталата.

20,42 г калия гидрофталата РО растворяют в 800 мл уксусной кислоты безводной, полученный раствор нагревают на водяной бане до растворения, защищая от действия влаги. Охлаждают до температуры 20 ºС и доводят объём раствора уксусной кислотой безводной до 1000,0 мл.

0,0167 М (0,1 н.) раствор калия дихромата.

4,90 г калия дихромата растворяют в воде и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл.

Установка титра. К 20,0 мл приготовленного раствора калия дихромата прибавляют 1 г калия йодида, 7 мл хлористоводородной кислоты разведенной 7,3 %, 250 мл воды и титруют 0,1 М раствором натрия тиосульфата до перехода окраски от синей к светло-зеленой, используя в качестве индикатора 3 мл 0,1 % раствора крахмала.

1 мл 0,1 М раствора натрия тиосульфата соответствует 4,903 мг $K_2Cr_2O_7$.

0,05 М раствор калия йодата.

10,7 г калия йодата растворяют в воде и доводят объем раствора водой до 1000,0 мл.

Установка титра. 25,0 мл приготовленного раствора калия йодата доводят водой до объема 100,0 мл. К 20,0 мл полученного раствора прибавляют 2 г калия йодида, 10 мл серной кислоты разведенной 9,8 %, и титруют 0,1 М раствором натрия тиосульфата, используя в качестве индикатора 1 мл 0,1 % раствора крахмала. Индикатор прибавляют в конце титрования.

1 мл 0,1 М раствора натрия тиосульфата соответствует 3,567 мг KIO_3.

0,0167 М (0,1 н.) раствор калия йодата.

3,567 г калия йодата растворяют в воде и доводят объем раствора водой до 1000,0 мл.

Установка титра. 20,0 мл приготовленного раствора калия йодата помещают в колбу с притертой пробкой, прибавляют 100 мл воды, 25 мл серной кислоты разведенной 9,8 %, 2 г калия йодида и оставляют на 10 мин в защищенном от света месте. Выделившийся йод титруют 0,1 М раствором натрия тиосульфата, используя в качестве индикатора 1 мл 0,1 % раствора крахмала. Индикатор прибавляют в конце титрования.

1 мл 0,1 М раствора натрия тиосульфата соответствует 3,567 мг KIO_3.

Хранят в сосудах темного стекла с притертыми пробками в защищенном от света месте.

0,001 М раствор калия йодида.

10,0 мл раствора калия йодида 166 г/л доводят водой до объема 100,0 мл. 5,0 мл полученного раствора доводят водой до объема 500,0 мл.

0,02 М раствор калия перманганата. 0,1 н. раствор калия перманганата.

3,2 г калия перманганата растворяют в воде и доводят объем раствора водой до 1000,0 мл; полученный раствор нагревают на водяной бане в течение 1 ч, охлаждают и фильтруют через стеклянный фильтр.

Установка титра. К 20,0 мл приготовленного раствора калия перманганата прибавляют 2 г калия йодида, 10 мл серной кислоты разведенной 9,8 % и титруют 0,1 М раствором натрия тиосульфата, используя в качестве индикатора 1 мл 0,1 % раствора крахмала. Индикатор прибавляют в конце титрования.

1 мл 0,1 М раствора тиосульфата натрия соответствует 3,161 мг $KMnO_4$.

Титр устанавливают непосредственно перед использованием.

Хранят в защищенном от света месте.

0,1 М раствор лития метоксида.

0,694 г лития небольшими порциями растворяют в 150 мл метанола безводного и доводят объем раствора толуолом до 1000,0 мл.

Установка титра. К 10,0 мл диметилформамида прибавляют 0,05 мл 0,3 % раствора тимолового синего в метаноле и титруют приготовленным раствором лития метоксида до получения синего окрашивания раствора. Немедленно прибавляют 0,200 г бензойной кислоты РО, перемешивают до растворения и титруют приготовленным раствором лития метоксида до повторного получения синего окрашивания раствора. Во время титрования раствор защищают от атмосферного углерода диоксида. Титр раствора лития метоксида устанавливают по объему титранта, израсходованного в повторном титровании.

1 мл 0,1 М раствора лития метоксида соответствует 12,21 мг $C_7H_6O_2$.

Титр устанавливают непосредственно перед использованием.

0,05 М раствор магния сульфата.

12,5 г магния сульфата растворяют в достаточном количестве воды и доводят объем раствора водой до 1000,0 мл.

Установка титра. 40,0 мл полученного раствора доводят водой до объёма 300 мл. Прибавляют 10 мл аммонийного буфера pH 10,0 и 50 мг тритурации эриохрома черного. Нагревают до 40 ºС и титруют при этой температуре 0,1 М раствором натрия эдетата до перехода окраски от фиолетовой к синей.

1 мл 0,1 М раствора натрия эдетата соответствует 24,65 мг $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$.

0,1 М раствор магния хлорида.

20,33 г магния хлорида растворяют в воде и доводят объем раствора водой до 1000,0 мл.

Установка титра. 25,0 мл полученного раствора доводят водой до 300 мл. Прибавляют 10 мл аммонийного буфера pH 10,0 и 50 мг тритурации эриохрома черного. Нагревают до 40 ºС и титруют при этой температуре 0,1 М раствором натрия эдетата до перехода окраски от фиолетовой к синей.

1 мл 0,1 М раствора натрия эдетата соответствует 20,33 мг $MgCl_2 \cdot 6 H_2O$.

0,02 М раствор меди сульфата.

5,0 г меди сульфата растворяют в воде и доводят объем раствора водой до 1000,0 мл.

Установка титра. К 20,0 мл полученного раствора меди сульфата прибавляют 2 г натрия ацетата, 0,1 мл 0,1 % раствора пиридилазонафтола и титруют 0,02 М раствором натрия эдетата до перехода окраски от фиолетово-синей до ярко-зеленой; вблизи точки эквивалентности титруют медленно.

1 мл 0,02 М раствора натрия эдетата соответствует 4,994 мг $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$.

0,1 М раствор натрия арсенита.

4,946 г мышьяка оксида РО растворяют в смеси 20 мл 10 М раствора натрия гидроксида и 20 мл воды, доводят объем раствора водой до 400,0 мл и нейтрализуют хлористоводородной кислотой разведенной 7,3 % по лакмусовой бумаге. Растворяют в полученном растворе 2,0 г натрия гидрокарбоната и доводят объем раствора водой до 500,0 мл.

0,025 М раствор натрия арсенита.

25 мл 0,1 М раствор натрия арсенита доводят водой до 100 мл.

0,001 М раствор натрия додецилсульфата.

0,2884 г натрия додецилсульфата, в пересчете на высушенное вещество (105 ºС в течение 2 ч), растворяют в воде и доводят объем раствора водой до 1000,0 мл.

Установка титра. К 50,0 мл полученного раствора прибавляют 15 мл хлороформа, 10 мл 1 М раствора серной кислоты и 1 мл раствора, содержащего по 0,003 % диметилового желтого и орацетового синего В в хлороформе. Титруют 0,004 М раствором бензэтония хлорида при энергичном встряхивании и разделении слоев после каждого добавления титранта до тех пор, пока хлороформный слой не приобретет постоянный (неисчезающий) зеленый цвет.

1 мл 0,004 М раствора бензэтония хлорида соответствует 1,154 мг $C_{12}H_{25}NaO_4S$.

1 М раствор натрия гидроксида. 1 М раствор натра едкого.

42 г натрия гидроксида растворяют в воде, свободной от углерода диоксида, и доводят объем раствора водой до 1000,0 мл.

Проверка на содержание карбонатов. 45,0 мл 1 М раствора хлористоводородной кислоты титруют приготовленным раствором натрия гидроксида (индикатор – фенолфталеин). К оттитрованному раствору прибавляют по каплям 1 М раствор хлористоводородной кислоты до исчезновения розового окрашивания и упаривают при кипячении до объема ~ 20 мл. В процессе кипячения при возникновении розового окрашивания прибавляют 1 М раствор хлористоводородной кислоты до обесцвечивания. Раствор охлаждают и, при наличии розовой окраски, прибавляют 1 М раствор хлористоводородной кислоты до обесцвечивания. Суммарное количество прибавленного 1 М раствора хлористоводородной кислоты не должно превышать 0,1 мл.

Установка титра (1). 20,0 мл 1 М раствора хлористоводородной кислоты титруют полученным раствором натрия гидроксида, используя в качестве индикатора 0,5 – 1,0 мл 1 % раствора фенолфталеина.

1 мл 1 М раствора хлористоводородной кислоты соответствует 40,00 мг NaOH.

Установка титра (2). Около 5,00 г (точная навеска) калия гидрофталата РО, предварительного тонко измельченного и высушенного при температуре 120 ºС в течение 2 ч, растворяют в 75 мл воды и титруют приготовленным раствором натра едкого (индикатор – фенолфталеин).

1 мл 1 М раствора натрия гидроксида соответствует 204,22 мг $C_8H_5KO_4$.

Титр устанавливают непосредственно перед использованием.

Хранить в плотно закрытых ёмкостях из тёмного стекла.

0,5 М раствор натрия гидроксида. 0,5 М раствор натра едкого.

21 г натрия гидроксида растворяют в воде, свободной от углерода диоксида, и доводят объем раствора той же водой до 1000,0 мл.

Проверка на содержание карбонатов. Проводят, как описано при приготовлении 1 М раствора натрия гидроксида. Для определения берут 45,0 мл 0,5 М раствора хлористоводородной кислоты.

Установка титра (1). 10,0 мл 0,5 М раствора хлористоводородной кислоты титруют, как указано при определении титра 1 М раствора натрия гидроксида.

1 мл 0,5 М раствора хлористоводородной кислоты соответствует 20,00 мг NaOH.

Установка титра (2). Около 2,50 г (точная навеска) калия гидрофталата РО, предварительно тонко измельченного и высушенного при температуре 120 ºС в течение 2 ч, растворяют в 50 мл воды. Далее поступают, как указано при установке титра 1 М раствора натрия гидроксида.

1 мл 0,5 М раствора натрия гидроксида соответствует 102,11 мг $C_8H_5KO_4$.

Хранить в плотно закрытых ёмкостях из тёмного стекла.

0,1 М раствор натрия гидроксида. 0,1 М раствор натра едкого.

100,0 мл 1 М раствора натрия гидроксида доводят водой, свободной от углерода диоксида, до объема 1000,0 мл.

Проверка на содержание карбонатов. Проводят, как описано при приготовлении 1 М раствора натрия гидроксида. Для определения берут 45 мл 0,1 М раствора хлористоводородной кислоты.

Установка титра (1). 10,0 мл 0,1 М раствора хлористоводородной кислоты титруют, как указано при определении титра 1 М раствора натрия гидроксида.

1 мл 0,1 М раствора хлористоводородной кислоты соответствует 4,00 мг NaOH.

Установка титра (2). Около 0,50 г (точная навеска) калия гидрофталата РО, предварительно тонко измельченного и высушенного при температуре 120 ºС в течение 2 ч, растворяют в 30 мл воды. Далее поступают, как указано при установке титра 1 М раствора натрия гидроксида.

1 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида соответствует 20,42 мг $C_8H_5KO_4$.

Хранить в плотно закрытых ёмкостях из тёмного стекла.

0,05 М раствор натрия гидроксида. 0,05 М раствор натра едкого.

50,0 мл 1 М раствора натрия гидроксида доводят водой, свободной от углерода диоксида, до объема 1000,0 мл.

Проверка на содержание карбонатов. Проводят, как описано при приготовлении 1 М раствора натрия гидроксида. Для определения берут 45 мл 0,05 М раствора хлористоводородной кислоты.

Установка титра (1). 10,0 мл 0,05 М раствора хлористоводородной кислоты титруют, как указано при определении титра 1 М раствора натрия гидроксида.

Установка титра (2). Около 0,25 г (точная навеска) калия гидрофталата РО, предварительно тонко измельченного и высушенного при температуре 120 ºС в течение 2 ч, растворяют в 30 мл воды. Далее поступают, как указано при установке титра 1 М раствора натрия гидроксида.

1 мл 0,05 М раствора натрия гидроксида соответствует 10,21 мг $C_8H_5KO_4$.

Хранить в плотно закрытых ёмкостях из тёмного стекла.

0,02 М раствор натрия гидроксида. 0,02 М раствор натра едкого.

20,0 мл 1 М раствора натрия гидроксида доводят водой, свободной от углерода диоксида, до объема 1000,0 мл.

Проверка на содержание карбонатов. Проводят, как описано при приготовлении 1 М раствора натрия гидроксида. Для определения берут 45 мл 0,02 М раствора хлористоводородной кислоты.

Установка титра. Около 0,10 г (точная навеска) калия гидрофталата РО, предварительно тонко измельченного и высушенного при температуре 120 ºС в течение 2 ч, растворяют в 30 мл воды. Далее поступают, как указано при установке титра 1 М раствора натрия гидроксида.

1 мл 0,02 М раствора натрия гидроксида соответствует 4,084 мг $C_8H_5KO_4$.

Хранить в плотно закрытых ёмкостях из тёмного стекла.

0,01 М раствор натрия гидроксида. 0,01 М раствор натра едкого.

10,0 мл 1 М раствора натрия гидроксида доводят водой, свободной от углерода диоксида, до объема 1000,0 мл.

Проверка на содержание карбонатов. Проводят, как описано при приготовлении 1 М раствора натрия гидроксида. Для определения берут 45 мл 0,01 М раствора хлористоводородной кислоты.

Установка титра. Около 0,05 г (точная навеска) калия гидрофталата РО, предварительно тонко измельченного и высушенного при температуре 120 ºС в течение 2 ч, растворяют в 30 мл воды. Далее поступают, как указано при установке титра 1 М раствора натрия гидроксида.

1 мл 0,01 М раствора натрия гидроксида соответствует 2,042 мг $C_6H_5KO_4$.

Хранить в плотно закрытых ёмкостях из тёмного стекла.

0,1 М раствор натрия гидроксида этанольный.

К 250 мл этанола безводного (спирт абсолютированный) прибавляют 3,3 г 10 М раствора натрия гидроксида.

Установка титра. 0,200 г (точная навеска) бензойной кислоты РО растворяют в 2 мл воды и 10 мл спирта 96 % и титруют приготовленным раствором натрия гидроксида этанольным, используя в качестве индикатора 0,2 мл 0,1 % раствора тимолфталеина.

1 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида этанольного соответствует 12,21 мг $C_7H_6O_2$.

Титр устанавливают непосредственно перед использованием.

Хранить в плотно закрытых ёмкостях из тёмного стекла.

0,1 М раствор натрия гидроксида в смеси метанола и бензола.

4,2 г натрия гидроксида растворяют в 100 мл метанола в мерной колбе вместимостью 1000,0 мл. Объем раствора доводят бензолом и метанолом до

метки, прибавляя их попеременно при помешивании. Соотношение метанола и бензола при приготовлении раствора должно быть примерно 1:4.

Примечание. В случае получения непрозрачного раствора его оставляют на 12 ч, после чего прозрачную жидкость быстро сливают с осадка.

*Установка титра***.** Около 0,100 г (точная навеска) бензойной кислоты РО растворяют в 20 мл диметилформамида, нейтрализованного непосредственно перед титрованием по 1 % раствору тимолового синего в диметилформамиде, и титруют приготовленным раствором натрия гидроксида в присутствии того же индикатора до перехода окраски от желтой к синей.

1 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида соответствует 12,21 мг $C_7H_6O_2$.

Титр устанавливают непосредственно перед использованием.

Примечание. Установку титра следует проводить в тщательно закрытых сосудах. Титрование рекомендуется проводить в атмосфере инертного газа.

Хранить в плотно закрытых ёмкостях из тёмного стекла.

0,1 М раствор натрия метоксида.

175 мл метанола безводного охлаждают в ледяной воде и прибавляют небольшими порциями около 2,5 г свеженарезанного натрия; когда металл растворится, доводят объём раствора толуолом до 1000,0 мл.

Установка титра. К 10 мл диметилформамида прибавляют 0,05 мл 0,3 % раствора тимолового синего в метаноле и титруют приготовленным раствором натрия метоксида до синего окрашивания. Тотчас прибавляют 0,200 г (точная навеска) бензойной кислоты РО, перемешивают до растворения и титруют приготовленным раствором натрия метоксида до повторного получения синего окрашивания. Во время титрования раствор защищают от атмосферного углерода диоксида. Титр раствора натрия метоксида устанавливают по объему титранта, израсходованного в повторном титровании.

1 мл 0,1 М раствора натрия метоксида соответствует 12,21 мг $C_7H_6O_2$.

Титр устанавливают непосредственно перед использованием.

0,1 М раствор натрия нитрита.

7,5 г натрия нитрита растворяют в воде и доводят объем раствора водой до 1000,0 мл.

Установка титра. 0,300 г (точная навеска) сульфаниловой кислоты РО растворяют в 50 мл 2 М раствора хлористоводородной кислоты, прибавляют 3 г калия бромида и охлаждают в бане со льдом. Полученный раствор титруют приготовленным раствором натрия нитрита, устанавливая конечную точку титрования электрометрически, используя в качестве индикаторного платиновый электрод, а в качестве электрода сравнения – хлорсеребряный или насыщенный каломельный, или с помощью внутренних индикаторов и внешнего индикатора (йодкрахмальная бумага). Титрование с тропеолином 00 проводят до перехода окраски от красной к желтой, со смесью тропеолина 00 с метиленовым синим – от красно-фиолетовой к голубой, с нейтральным красным – от красно-фиолетовой к синей. Выдержку в конце титрования с нейтральным красным увеличивают до 2 мин.

Титрование с йодкрахмальной бумагой ведут до тех пор, пока капля титруемого раствора, взятая через 1 мин после прибавления раствора нитрита натрия, не будет немедленно вызывать синее окрашивание на бумаге. Параллельно проводят контрольный опыт. В некоторых случаях выдержка может быть увеличена, о чем должно быть указано в фармакопейной статье.

1 мл 0,1 М раствора натрия нитрита соответствует 17,32 мг $C_6H_7NO_3S$.

0,1 М раствор натрия перйодата.

21,4 г натрия перйодата растворяют в 500 мл воды и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл.

Установка титра. К 20,0 мл приготовленного раствора прибавляют 5 мл хлорной кислоты, закрывают колбу пробкой и перемешивают. Доводят pH раствора до 6,4 насыщенным раствором натрия гидрокарбоната. Прибавляют 10 мл 16,6 % раствора калия йодида, закрывают пробкой, перемешивают, выдерживают 2 мин и титруют 0,025 М раствором натрия арсенита до слабо-

желтого окрашивания, затем прибавляют 2 мл раствора крахмала и титруют до обесцвечивания раствора.

1 мл 0,025 М раствора натрия арсенита соответствует 5,348 мг $NaIO_4$.

0,1 М раствор натрия тиосульфата.

25 г натрия тиосульфата и 0,2 г натрия карбоната растворяют в воде, свободной от углерода диоксида, и доводят объем раствора той же водой до 1000,0 мл.

Установка титра.

Способ 1. К 20,0 мл 0,0167 М раствора калия бромата прибавляют 40 мл воды, 10 мл 16,6 % раствора калия йодида, 5 мл 7 М раствора хлористоводородной кислоты и титруют приготовленным раствором натрия тиосульфата, используя в качестве индикатора 1 мл 0,1 % раствора крахмала. Индикатор прибавляют в конце титрования.

1 мл 0,1 М раствора натрия тиосульфата соответствует 2,784 мг $KBrO_3$.

Способ 2. Около 0,15 г (точная навеска) калия дихромата РО растворяют в 50 мл воды в колбе с притертой пробкой, прибавляют 2 г калия йодида, 5 мл хлористоводородной кислоты 25 %, закрывают пробкой, смоченной 10 % раствором калия йодида, и оставляют в защищенном от света месте на 10 мин. Прибавляют 100 мл воды, промывая пробку водой, и титруют приготовленным раствором натрия тиосульфата до зеленовато-желтого окрашивания. Затем прибавляют 2 мл раствора крахмала и продолжают титровать до перехода синей окраски в светло-зеленую.

1 мл 0,1 М раствора натрия тиосульфата соответствует 4,903 мг $K_2Cr_2O_7$.

Хранят в сосудах темного стекла с притертыми пробками в защищенном от света и углекислоты месте.

0,005 М раствор натрия тиосульфата.

25,0 мл 0,1 М раствора натрия тиосульфата доводят водой, свободной от углерода диоксида, до объема 500,0 мл.

Используют свежеприготовленный раствор.

Установка титра.

Способ 1. К 5,0 мл 0,0083 М раствора калия бромата прибавляют 35 мл воды, 10 мл 16,6 % раствора калия йодида, 5 мл 7 М раствора хлористоводородной кислоты и титруют приготовленным раствором натрия тиосульфата, используя в качестве индикатора 1 мл 0,1 % раствора крахмала. Индикатор прибавляют в конце титрования.

1 мл 0,005 М раствора натрия тиосульфата соответствует 0,139 мг $KBrO_3$.

Способ 2. Около 0,15 г (точная навеска) калия дихромата РО растворяют в воде в мерной колбе вместимостью 250 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. 25 мл полученного раствора калия дихромата помещают в колбу с притертой пробкой, прибавляют 0,2 г калия йодида, 3 мл хлористоводородной кислоты 25 %, закрывают пробкой, смоченной 10 % раствором калия йодида, и оставляют в защищенном от света месте на 10 мин. Прибавляют 50 мл воды, промывая пробку водой, и титруют как описано при установке титра 0,1 М раствора натрия тиосульфата по способу 2.

1 мл 0,005 М раствора натрия тиосульфата соответствует 0,2452 мг $K_2Cr_2O_7$.

0,1 М раствор натрия эдетата. 0,1 М раствор трилона Б.

37,5 г натрия эдетата растворяют в 500 мл воды, прибавляют 100 мл 1 М раствора натрия гидроксида и доводят объем раствора водой до 1000,0 мл.

Установка титра. 0,120 г цинка РО растворяют в 4 мл 7 М раствора хлористоводородной кислоты и прибавляют 0,1 мл бромной воды; избыток брома удаляют кипячением, прибавляют 2 М раствор натрия гидроксида до слабокислой или нейтральной реакции, разбавляют водой до 200 мл, прибавляют 50 мг индикаторной смеси ксиленолового оранжевого и достаточное количество гексаметилентетрамина до фиолетово-розового окрашивания, прибавляют ещё 2 г гексаметилентетрамина и титруют

приготовленным раствором натрия эдетата до изменения окраски от фиолетово-розовой к жёлтой.

1 мл 0,1 М раствора натрия эдетата соответствует 6,54 мг Zn.

0,05 М раствор натрия эдетата. 0,05 М раствор трилона Б.

18,6 г натрия эдетата растворяют в воде и доводят объем раствора водой до 1000,0 мл.

Установка титра. 0,060 г цинка РО растворяют в 4 мл 7 М раствора хлористоводородной кислоты и добавляют 0,1 мл бромной воды. Далее поступают, как указано при установке титра 0,1 М раствора натрия эдетата.

1 мл 0,05 М раствора натрия эдетата соответствует 3,269 мг Zn.

0,02 М раствор натрия эдетата.

7,444 г натрия эдетата растворяют в воде и доводят объем раствора водой до 1000,0 мл.

Установка титра. 0,030 г цинка РО растворяют в 4 мл 7 М раствора хлористоводородной кислоты и добавляют 0,1 мл бромной воды. Далее поступают, как указано при установке титра 0,1 М раствора натрия эдетата.

1 мл 0,02 М раствора натрия эдетата соответствует 1,308 мг Zn.

0,05 М (0,1 н.) раствор ртути(II) нитрата. 0,05 М раствор ртути окисной нитрата.

17,2 г ртути(II) нитрата растворяют в 50 мл 1 М раствора азотной кислоты и разбавляют водой до 1000,0 мл.

Установка титра. 0,150 г (точная навеска) натрия хлорида РО растворяют в 50 мл воды и титруют приготовленным раствором ртути(II) нитрата, используя в качестве индикатора 0,5 мл 1 % спиртового раствора дифенилкарбазона.

1 мл 0,05 М раствора ртути окисной нитрата соответствует 5,844 мг NaCl.

0,1 М раствор серебра нитрата.

17,0 г серебра нитрата растворяют в воде и доводят объем раствора водой до 1000,0 мл.

Установка титра.

Способ 1. 0,150 г (точная навеска) натрия хлорида РО растворяют в 50 мл воды и титруют приготовленным раствором серебра нитрата до появления красноватого осадка, используя в качестве индикатора 5 % раствор калия хромата. Параллельно проводят контрольный опыт.

1 мл 0,1 М раствора серебра нитрата соответствует 5,844 мг NaCl.

Способ 2. 0,100 г (точная навеска) натрия хлорида РО растворяют в 30 мл воды и титруют потенциометрически приготовленным раствором нитрата серебра. Параллельно проводят контрольный опыт.

1 мл 0,1 М раствора нитрата серебра соответствует 5,844 мг NaCl.

Хранят в защищенном от света месте.

0,01 М раствор серебра нитрата.

50,0 мл 0,1 М раствора серебра нитрата разбавляют водой до объёма 500,0 мл.

0,001 М раствор серебра нитрата.

5,0 мл 0,1 М раствора серебра нитрата доводят водой до объёма 500,0 мл.

0,5 М (1 н.) раствор серной кислоты.

30 мл серной кислоты концентрированной осторожно вливают в воду и доводят объем раствора водой до 1000,0 мл.

Установка титра. 1,000 г (точная навеска) натрия карбоната безводного РО растворяют в 50 мл воды, прибавляют 0,1 мл 0,1 % раствора метилового оранжевого (раствор окрашивается в жёлтый цвет). Титруют приготовленным раствором серной кислоты до красновато-жёлтого окрашивания. Кипятят около 2 мин (раствор снова приобретает жёлтое окрашивание), охлаждают и титруют вновь до повторного появления красновато-жёлтого окрашивания.

1 мл 0,5 М раствора серной кислоты соответствует 53,00 мг Na_2CO_3.

0,05 М (0,1 н.) раствор серной кислоты.

100,0 мл 0,5 М раствора серной кислоты доводят водой до объёма 1000,0 мл.

0,1 М раствор свинца(II) нитрата.

33 г свинца(II) нитрата растворяют в воде и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл.

Установка титра. К 20,0 мл приготовленного раствора свинца нитрата прибавляют 300 мл воды, 50 мг тритурации ксиленолового оранжевого и достаточное количество гексаметилентетрамина до появления фиолетово-розового окрашивания. Титруют 0,1 М раствором натрия эдетата до появления жёлтого окрашивания.

1 мл 0,1 М раствора натрия эдетата соответствует 33,12 мг $Pb(NO_3)_2$.

0,05 М раствор свинца(II) нитрата.

16,5 г свинца(II) нитрата растворяют в достаточном количестве воды и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл.

Установка титра. К 50,0 мл приготовленного раствора добавляют 300 мл воды. Далее поступают, как указано в установке титра 0,1 М раствора свинца нитрата.

0,1 М раствор тетрабутиламмония гидроксида.

40 г тетрабутиламмония йодида растворяют в 90 мл метанола безводного, прибавляют 20 г тонко измельченного серебра оксида и энергично встряхивают в течение 1 ч. Центрифугируют несколько миллилитров смеси и проводят испытание жидкости над осадком на йодиды. При получении положительной реакции дополнительно прибавляют 2 г серебра оксида и встряхивают в течение последующих 30 мин; эту процедуру повторяют до тех пор, пока жидкость не будет свободна от йодидов. Смесь фильтруют через стеклянный фильтр, промывают реакционный сосуд и фильтр 3 порциями, по 50 мл каждая, толуола. К полученному фильтрату прибавляют промывной толуол и доводят объем раствора толуолом до 1000,0 мл. Через раствор пропускают сухой азот, свободный от углерода диоксида, в течение 5 мин.

Установка титра. К 10 мл диметилформамида прибавляют 0,05 мл 0,3 % раствора тимолового синего в метаноле и титруют приготовленным раствором тетрабутиламмония гидроксида до чистого синего окрашивания. Тотчас прибавляют 0,200 г (точная навеска) бензойной кислоты РО, перемешивают до растворения и продолжают титрование до синего окрашивания. Титр раствора тетрабутиламмония гидроксида устанавливают по объему титранта, израсходованного в повторном титровании.

1 мл 0,1 М раствора тетрабутиламмония гидроксида соответствует 12,21 мг $C_7H_6O_2$.

Титр устанавливают непосредственно перед использованием.

0,1 М раствор тетрабутиламмония гидроксида в 2-пропаноле.

Раствор готовят, как указано для 0,1 М раствора тетрабутиламмония гидроксида, используя в качестве растворителя 2-пропанол вместо толуола.

Установка титра. Титр устанавливают, как указано для 0,1 М раствора тетрабутиламмония гидроксида.

0,01 М раствор тетрабутиламмония йодида.

4 г тетрабутиламмония йодида растворяют в достаточном количестве воды и доводят объем раствора водой до 1000,0 мл.

Установка титра. К 25,0 мл приготовленного раствора прибавляют 50 мл 0,01 М раствора серебра нитрата, 0,5 мл 2 М раствора азотной кислоты и титруют избыток серебра нитрата 0,01 М раствором аммония тиоцианата, используя в качестве индикатора 0,5 мл 0,2 % раствора железа(III) аммония сульфата.

1 мл 0,01 М раствора серебра нитрата соответствует 3,694 мг $C_{16}H_{36}IN$.

0,1 М раствор тетраэтиламмония гидроксида.

30 г тетраэтиламмония йодида растворяют в 200 мл метанола и встряхивают в течение 1 ч с 25 г тонко измельченного серебра оксида в стеклянном сосуде с притертой пробкой. По окончании встряхивания центрифугируют несколько миллилитров смеси и раствор испытывают на присутствие йодидов. При положительной реакции к основному раствору

прибавляют еще 5 г серебра оксида и снова встряхивают 30 мин; эту процедуру повторяют до тех пор, пока жидкость не будет свободна от йодидов; смесь фильтруют через стеклянный фильтр. Реакционную колбу ополаскивают 3 порциями, по 50 мл каждая, сухого бензола, бензольный раствор фильтруют через тот же фильтр и прибавляют к фильтрату. Фильтрат доводят бензолом до объема 1000,0 мл. Через полученный раствор пропускают сухой азот, свободный от углерода диоксида, в течение 5 мин.

Установка титра. К смеси 5 мл метанола и 20 мл ацетона прибавляют 0,05 мл 0,3 % раствора тимолового синего в метаноле и титруют приготовленным раствором тетраэтиламмония гидроксида до чистого синего окрашивания. Сразу же прибавляют 0,200 г (точная навеска) бензойной кислоты РО, перемешивают до растворения и продолжают титрование до синего окрашивания. Титр устанавливают по объему титранта, израсходованного при повторном титровании.

1 мл 0,1 М раствора тетраэтиламмония гидроксида соответствует 12,21 мг $C_7H_6O_2$.

1 М раствор хлористоводородной кислоты.

87,0 мл хлористоводородной кислоты концентрированной доводят водой до объёма 1000,0 мл.

Установка титра. 1,000 г (точная навеска) натрия карбоната безводного РО растворяют в 50 мл воды, прибавляют 0,1 мл 0,1 % раствора метилового оранжевого (раствор окрашивается в жёлтый цвет) и титруют приготовленным раствором хлористоводородной кислоты до красновато-жёлтого окрашивания. Кипятят в течение 2 мин (раствор снова приобретает жёлтое окрашивание), охлаждают и продолжают титрование до красновато-жёлтого окрашивания.

1 мл 1 М раствора хлористоводородной кислоты соответствует 53,00 мг Na_2CO_3.

0,5 М раствор хлористоводородной кислоты.

43,5 мл концентрированной хлористоводородной кислоты доводят водой до объёма 1000,0 мл.

Установка титра. 0,600 г (точная навеска) натрия карбоната безводного РО растворяют в 100 мл воды. Далее поступают, как при установке титра 1 М раствора хлористоводородной кислоты.

1 мл 0,5 М раствора хлористоводородной кислоты соответствует 26,50 мг Na_2CO_3.

0,1 М раствор хлористоводородной кислоты.

100,0 мл 1 М раствора хлористоводородной кислоты доводят водой до объёма 1000,0 мл.

1 мл 0,1 М раствора хлористоводородной кислоты соответствует 5,30 мг Na_2CO_3.

0,01 М раствор хлористоводородной кислоты.

10,0 мл 1 М раствора хлористоводородной кислоты доводят водой до объёма 1000,0 мл.

1 мл 0,01 М раствора хлористоводородной кислоты соответствует 0,53 мг Na_2CO_3.

0,1 М раствор хлористоводородной кислоты спиртовой.

9,0 мл хлористоводородной кислоты концентрированной доводят спиртом 96 %, свободным от альдегидов, до объёма 1000,0 мл.

0,1 М раствор хлорной кислоты.

К 900 мл уксусной кислоты ледяной прибавляют 8,5 мл 70 % или 11 мл 60 % раствора хлорной кислоты, перемешивают, добавляют 30 мл уксусного ангидрида и доводят объем раствора уксусной кислотой ледяной до 1000,0 мл, перемешивают и оставляют на 24 ч. Содержание воды определяют методом К. Фишера без добавления метанола и, если необходимо, прибавляют воду или уксусный ангидрид до содержания воды от 0,1 до 0,2 %. Оставляют на 24 ч.

Установка титра. 0,350 г (точная навеска) калия гидрофталата РО растворяют в 50 мл уксусной кислоты безводной, если необходимо,

осторожно нагревая, охлаждают и титруют приготовленным раствором хлорной кислоты, используя в качестве индикатора 0,05 мл 0,5 % раствора кристаллического фиолетового, до перехода фиолетовой окраски раствора в голубовато-зелёную.

1 мл 0,1 М раствора хлорной кислоты соответствует 20,42 мг $C_8H_5KO_4$.

Примечание. Если температура, при которой проводится количественное определение, отличается от температуры, при которой был установлен титр 0,1 М раствора хлорной кислоты, то вводят температурную поправку. Объем (V_c), необходимый для количественного определения, вычисляют по формуле:

$$V_c = V\,[1 + (t_1 - t_2)\,0{,}0011],$$

где t_1 – температура, при которой устанавливают титр;
t_2 – температура, при которой проводят количественное определение;
V – объём, израсходованный на титрование фактически, мл.

0,05 М раствор хлорной кислоты.

50,0 мл 0,1 М раствора хлорной кислоты доводят уксусной кислотой безводной до объема 100,0 мл.

0,1 М раствор хлорной кислоты в метаноле.

К 11 мл 60 % или 8,5 мл 70 % раствора хлорной кислоты прибавляют 500 мл метанола, очищенного от карбонилсодержащих соединений, и доводят объём раствора тем же метиловым спиртом до 1000,0 мл.

Установка титра. Около 0,1 г натрия салицилата (точная навеска), предварительно дважды перекристаллизованного из спирта 96 % и высушенного до постоянной массы, растворяют в 10 мл метанола, прибавляют равный объём ацетона, 2 капли 0,3 % раствора тимолового синего в метаноле и титруют приготовленным раствором хлорной кислоты до перехода окраски от жёлтой к розовой.

1 мл 0,1 М раствора хлорной кислоты соответствует 16,01 мг $C_7H_5NaO_3$.

0,1 М раствор хлорной кислоты в нитрометане.

К 11 мл 60 % или 8,5 мл 70 % раствора хлорной кислоты прибавляют 500 мл нитрометана и доводят объём раствора нитрометаном до 1000,0 мл.

Установка титра. Как описано при установке титра 0,1 М раствора хлорной кислоты.

0,1 М раствор уксусной кислоты.

6,0 г уксусной кислоты ледяной доводят водой до объема 1000,0 мл.

Установка титра. К 25,0 мл приготовленного раствора уксусной кислоты прибавляют 0,5 мл 0,1 % раствора фенолфталеина и титруют 0,1 М раствором натрия гидроксида.

1 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида соответствует 6,01 мг $C_2H_4O_2$.

0,1 М раствор церия(IV) сульфата.

40,4 г церия(IV) сульфата растворяют в смеси 500 мл воды и 50 мл серной кислоты концентрированной; охлаждают и доводят объем раствора водой до 1000,0 мл.

Установка титра. К 25,0 мл приготовленного раствора церия(IV) сульфата прибавляют 2,0 г калия йодида, 150 мл воды и тотчас титруют 0,1 М раствором натрия тиосульфата, используя в качестве индикатора 1 мл 0,1 % раствора крахмала.

1 мл 0,1 М раствора натрия тиосульфата соответствует 40,43 мг $Ce(SO_4)_2 \cdot 4\ H_2O$.

0,05 М раствор цинка хлорида.

6,82 г цинка хлорида растворяют в воде. Если необходимо, по каплям прибавляют хлористоводородную кислоту разведенную 7,3 % до исчезновения опалесценции и доводят объем раствора водой до 1000,0 мл.

Установка титра. К 20,0 мл приготовленного раствора цинка хлорида прибавляют 5 мл 2 М раствора уксусной кислоты, разбавляют до 200 мл водой, добавляют 50 мг тритурации ксиленолового оранжевого и достаточное количество гексаметилентетрамина до появления фиолетово-розового окрашивания, добавляют еще 2 г гексаметилентетрамина и титруют

0,1 М раствором натрия эдетата до перехода окрашивания от фиолетово-розового до жёлтого.

1 мл 0,1 М раствора натрия эдетата соответствует 13,63 мг $ZnCl_2$.

0,1 М раствор цинка сульфата.

29 г цинка сульфата растворяют в воде и доводят объем раствора водой до 1000,0 мл.

Установка титра. К 20,0 мл приготовленного раствора цинка сульфата прибавляют 5 мл 2 М раствора уксусной кислоты, разбавляют водой до 200 мл. Далее поступают, как при установке титра 0,05 М раствора цинка хлорида.

1 мл 0,1 М раствора натрия эдетата соответствует 28,75 мг $ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$.

Буферные растворы **ОФС.1.3.0003.15**

Взамен ГФ XII, ч.1, ОФС 42-0072-07

Успешное выполнение многих фармакопейных испытаний и методик количественного и качественного анализа требует регулирования или поддержания на определённом уровне величины pH с помощью буферных растворов.

Буферные растворы – растворы с определённой концентрацией водородных ионов (pH), содержащие сопряжённую кислотно-основную пару, обеспечивающую устойчивость величины их водородного показателя при незначительном изменении концентрации, либо при добавлении небольшого количества кислоты или основания.

Забуференные растворы – это системы, в которых конкретный ион находится в равновесии с веществами, способными связывать или высвобождать этот ион. Забуференные растворы способны сохранять активность определенного иона при добавлении веществ, которые, как ожидается, могут изменять активность этого иона.

В фармакопейном анализе применяют кислотные буферные системы (раствор слабой кислоты и ее соли) и основные буферные системы (раствор слабого основания и его соли). pH таких смесей мало меняется при разбавлении в довольно широких пределах (1:100), а также при добавлении небольших количеств сильных кислот или оснований.

Буферный раствор характеризуется значением создаваемого pH и буферной емкостью. Буферная емкость системы определяется количеством моль кислоты или основания (в грамм-эквивалентах на 1 л), добавление

которых изменяет pH 1 л ($дм^3$) буферного раствора на 1 единицу pH. Емкость буферного раствора регулируется концентрацией буферных веществ.

Буферные растворы используются для установления и поддержания активности иона в узком диапазоне pH.

Буферные растворы используются в основном:

а) для калибровки pH-метров;

б) в аналитических методиках;

в) для достижения изотоничности при приготовлении жидких лекарственных форм;

г) для поддержания стабильности дозированных лекарственных форм.

Компоненты буферной системы для целей химического анализа должны сочетаться с определяемым веществом и используемыми реактивами. Буферные и забуференные растворы готовят на воде очищенной. Также можно использовать воду дистиллированную и воду для хроматографии. Буферные и забуференные растворы после приготовления следует тщательно перемешать.

Забуференный ацетоновый раствор

8,15 г натрия ацетата и 42,0 г натрия хлорида растворяют в воде, прибавляют 68,0 мл 0,1 М раствора хлористоводородной кислоты, 150 мл ацетона и доводят объём раствора водой до 500,0 мл.

Буферный раствор pH 2,0

6,57 г калия хлорида растворяют в воде, прибавляют 119,0 мл 0,1 М раствора хлористоводородной кислоты и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл.

Фосфатный буферный раствор pH 2,0

8,95 г динатрия гидрофосфата и 3,40 г калия дигидрофосфата растворяют в воде и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл. Доводят pH до 2,0 потенциометрически с помощью фосфорной кислоты концентрированной.

Сульфатный буферный раствор pH 2,0

132,1 г аммония сульфата растворяют в воде, доводят объём раствора водой

до 500,0 мл (раствор I).

Осторожно при постоянном охлаждении и перемешивании прибавляют 14 мл серной кислоты концентрированной к 400,0 мл воды; охлаждают и доводят объём раствора водой до 500,0 мл (раствор II).

Смешивают равные объёмы растворов I и II; если необходимо, доводят pH до 2,0 потенциометрически раствором I или II.

Буферный раствор pH 2,5

100,0 г калия дигидрофосфата растворяют в 800 мл воды, доводят pH до 2,5 потенциометрически с помощью хлористоводородной кислоты концентрированной и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл.

Буферный раствор pH 2,5 (1)

4,9 г фосфорной кислоты разведённой 10 % смешивают с 250 мл воды, доводят pH до 2,5 потенциометрически с помощью раствора натрия гидроксида разведённого 8,5 % и доводят объём раствора водой до 500,0 мл.

Буферный раствор pH 3,0

21,0 г лимонной кислоты растворяют в 200,0 мл 1 М раствора натрия гидроксида и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл.

40,3 мл полученного раствора доводят 0,1 М раствором хлористоводородной кислоты до 100,0 мл.

0,25 М цитратный буферный раствор pH 3,0

4,8 г лимонной кислоты растворяют в 80,0 мл воды. Доводят pH до 3,0 потенциометрически с помощью 1 М раствора натрия гидроксида и доводят объём раствора водой до 100,0 мл.

0,1 М фосфатный буферный раствор pH 3,0

12,0 г натрия дигидрофосфата безводного растворяют в воде. Доводят pH до 3,0 потенциометрически с помощью фосфорной кислоты разведённой 10 % и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл.

Фосфатный буферный раствор pH 3,0

0,7 мл фосфорной кислоты концентрированной смешивают с 100 мл воды и доводят объём раствора водой до 900,0 мл. Доводят pH до 3,0 с помощью

раствора натрия гидроксида концентрированного и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл.

Фосфатный буферный раствор pH 3,0 (1)

3,40 г калия дигидрофосфата растворяют в 900 мл воды. Доводят pH до 3,0 потенциометрически с помощью фосфорной кислоты концентрированной и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл.

Фосфатный буферный раствор pH 3,2

900,0 мл 4 г/л раствора натрия дигидрофосфата смешивают с 100 мл 2,5 г/л раствора фосфорной кислоты концентрированной. Если необходимо, доводят pH до 3,2 потенциометрически раствором натрия дигидрофосфата или фосфорной кислоты концентрированной.

Фосфатный буферный раствор pH 3,2 (1)

Доводят pH до 3,2 потенциометрически для 35,8 г/л раствора динатрия гидрофосфата с помощью фосфорной кислоты разведённой 10 %.

100,0 мл полученного раствор доводят водой до объема 2000,0 мл.

Буферный раствор pH 3,5

25,0 г аммония ацетата растворяют в 25,0 мл воды, прибавляют 38,0 мл 25 % хлористоводородной кислоты. Если необходимо, доводят pH до 3,5 потенциометрически с помощью хлористоводородной кислоты разведённой 7,3 % или 10% раствора аммиака и доводят объём раствора водой до 100,0 мл.

Фосфатный буферный раствор pH 3,5

68,0 г калия дигидрофосфата растворяют в воде, доводят pH до 3,5 потенциометрически с помощью фосфорной кислоты концентрированной. Доводят объём раствора водой до 1000,0 мл.

Буферный раствор pH 3,6

250,0 мл 0,2 М раствора калия гидрофталата смешивают с 11,94 мл 0,2 М раствора хлористоводородной кислоты и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл.

Буферный раствор pH 3,7

15,0 мл уксусной кислоты разведенной 30 % смешивают с 60,0 мл спирта 96 % и 20,0 мл воды. Доводят pH до 3,7 потенциометрически с помощью раствора аммиака и доводят объём раствора водой до 100,0 мл.

Забуференный раствор меди сульфата pH 4,0

0,25 г меди (II) сульфата и 4,5 г аммония ацетата растворяют в уксусной кислоте разведённой 12 % и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл.

Ацетатный буферный раствор pH 4,4

136,0 г натрия ацетата и 77,0 г аммония ацетата растворяют в воде и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл; прибавляют 250,0 мл уксусной кислоты ледяной и перемешивают.

Фталатный буферный раствор pH 4,4

2,042 г калия гидрофталата растворяют в 50,0 мл воды, прибавляют 7,5 мл 0,2 М раствора натрия гидроксида и доводят водой до объёма 200,0 мл.

0,05 М фосфатный буферный раствор pH 4,5

6,80 г калия дигидрофосфата растворяют в 1000,0 мл воды.

Ацетатный буферный раствор pH 4,5

77,1 г аммония ацетата растворяют в воде, прибавляют 70,0 мл уксусной кислоты ледяной и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл.

Натрия ацетатный буферный раствор pH 4,5

63,0 г натрия ацетата безводного растворяют в воде, прибавляют 90,0 мл уксусной кислоты разведенной 30 %. Доводят pH до 4,5 потенциометрически уксусной кислотой разведённой 30% и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл.

Ацетатный буферный раствор pH 4,6

5,4 г натрия ацетата растворяют в 50,0 мл воды, прибавляют 2,4 г уксусной кислоты ледяной и доводят объём раствора водой до 100,0 мл; если необходимо, доводят pH до 4,6 потенциометрически уксусной кислотой ледяной.

Сукцинатный буферный раствор pH 4,6

11,8 г янтарной кислоты растворяют в смеси 600,0 мл воды и 82,0 мл 1 М раствора натрия гидроксида и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл.

Ацетатный буферный раствор pH 4,7

136,1 г натрия ацетата растворяют в 500,0 мл воды. 250,0 мл полученного раствора смешивают с 250,0 мл уксусной кислоты разведённой 12 %. Встряхивают дважды со свежеприготовленным отфильтрованным 0,1 г/л раствором дитизона в хлороформе. Встряхивают с углерода тетрахлоридом до обесцвечивания экстракта. Водный слой фильтруют для удаления следов углерода тетрахлорида.

Ацетатный буферный раствор pH 5,0

К 120,0 мл 6,0 г/л раствора уксусной кислоты ледяной прибавляют 100,0 мл 0,1 М раствора калия гидроксида и 250,0 мл воды, перемешивают. Доводят pH до 5,0 потенциометрически с помощью 6 г/л раствора уксусной кислоты ледяной или 0,1 М раствора калия гидроксида и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл.

Цитратный буферный раствор pH 5,0

20,1 г лимонной кислоты и 8,0 г натрия гидроксида растворяют в воде и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл. Доводят pH до 5,0 потенциометрически с помощью хлористоводородной кислоты разведённой 7,3 %.

Фосфатный буферный раствор pH 5,0

2,72 г калия дигидрофосфата растворяют в 800,0 мл воды. Доводят pH до 5,0 потенциометрически с помощью 1 М раствора калия гидроксида и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл.

Буферный раствор pH 5,2

1,02 г калия гидрофталата растворяют в 30,0 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида и доводят объём раствора водой до 100,0 мл.

0,067 М фосфатный буферный раствор pH 5,4

Смешивают необходимые объёмы 23,99 г/л раствора динатрия гидрофосфата и 9,12 г/л раствора натрия дигидрофосфата моногидрата, чтобы получить pH

5,4. Доводят pH до 5,4 потенциометрически.

Буферный раствор pH 5,5

54,4 г натрия ацетата растворяют в 50,0 мл воды, если необходимо, нагревают до температуры 35 °С. После охлаждения полученного раствора к нему медленно приливают 10,0 мл уксусной кислоты безводной, перемешивают и доводят объём раствора водой до 100,0 мл.

Ацетатно-эдетатный буферный раствор pH 5,5

250,0 г аммония ацетата и 15,0 г натрия эдетата растворяют в 400,0 мл воды и прибавляют 125,0 мл уксусной кислоты ледяной.

Фосфатный буферный раствор pH 5,5

Раствор I. 13,61 г калия дигидрофосфата растворяют в воде и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл.

Раствор II. 35,81 г динатрия гидрофосфата растворяют в воде и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл.

Смешивают 96,4 мл раствора I и 3,6 мл раствора II.

Фосфатно-цитратный буферный раствор pH 5,5

56,85 мл 28,4 г/л раствора динатрия гидрофосфата безводного смешивают с 43,15 мл 21,0 г/л раствора лимонной кислоты.

Фосфатный буферный раствор pH 5,8

1,19 г динатрия гидрофосфата дигидрата и 8,25 г калия дигидрофосфата растворяют в воде и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл.

Ацетатный буферный раствор pH 6,0

100,0 г аммония ацетата растворяют в 300,0 мл воды, приливают 4,1 мл уксусной кислоты ледяной. Если необходимо, доводят pH до 6,0 с помощью раствора аммиака или уксусной кислоты разведенной 30 % и доводят объём раствора водой до 500,0 мл.

Диэтиламмония фосфата буферный раствор pH 6,0

68,0 мл фосфорной кислоты концентрированной осторожно разбавляют водой до 500,0 мл. 25,0 мл полученного раствора смешивают с 450,0 мл воды и 6,0 мл диэтиламина. Если необходимо, доводят pH до (6 ± 0,05)

потенциометрически с помощью диэтиламина или кислоты фосфорной концентрированной и доводят объём раствора водой до 500,0 мл.

Фосфатный буферный раствор pH 6,0

63,2 мл 71,5 г/л раствора динатрия гидрофосфата смешивают с 36,8 мл 21 г/л раствора лимонной кислоты.

Фосфатный буферный раствор pH 6,0 (1)

6,8 г натрия дигидрофосфата растворяют в воде и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл. Доводят pH до 6,0 потенциометрически с помощью раствора натрия гидроксида концентрированного.

Фосфатный буферный раствор pH 6,0 (2)

250,0 мл 0,2 М раствора калия дигидрофосфата смешивают с 28,5 мл 0,2 М раствора натрия гидроксида и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл.

Фосфатный буферный раствор pH 6,4

2,5 г динатрия гидрофосфата, 2,5 г натрия дигидрофосфата и 8,2 г натрия хлорида растворяют в 950,0 мл воды. Если необходимо, доводят pH до 6,4 потенциометрически с помощью 1 М раствора натрия гидроксида или 1 М раствора хлористоводородной кислоты и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл.

Фосфатный буферный раствор pH 6,4 (1)

1,79 г динатрия гидрофосфата, 1,36 г калия дигидрофосфата и 7,02 г натрия хлорида растворяют в воде и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл.

0,5 М фталатный буферный раствор pH 6,4

100,0 г калия гидрофталата растворяют в воде и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл. Доводят pH до 6,4 потенциометрически с помощью раствора натрия гидроксида концентрированного.

Буферный раствор pH 6,5

60,5 г динатрия гидрофосфата и 46,0 г калия дигидрофосфата растворяют в воде, прибавляют 100,0 мл 0,02 М раствора натрия эдетата, 20 мг ртути (II) хлорида и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл.

Фосфатный буферный раствор pH 6,5

2,75 г натрия дигидрофосфата и 4,5 г натрия хлорида растворяют в 500 мл воды. Доводят pH до 6,5 потенциометрически с помощью фосфатного буферного раствора pH 8,5.

0,1 М фосфатный буферный раствор pH 6,5

13,80 г натрия дигидрофосфата моногидрата растворяют в 900,0 мл воды. Доводят pH до 6,5 потенциометрически с помощью раствора натрия гидроксида концентрированного и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл.

Имидазольный буферный раствор pH 6,5

6,81 г имидазола, 1,23 г магния сульфата и 0,73 г кальция сульфата растворяют в 752 мл 0,1 М раствора хлористоводородной кислоты. Если необходимо, доводят pH до 6,5 потенциометрически 0,1 М раствором хлористоводородной кислоты и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл.

Фосфатный буферный раствор pH 6,6

250,0 мл 0,2 М раствора калия дигидрофосфата смешивают с 89,0 мл 0,2 М раствора натрия гидроксида и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл.

Фосфатный забуференный физиологический раствор pH 6,8

1,0 г калия дигидрофосфата, 2,0 г дикалия гидрофосфата и 8,5 г натрия хлорида растворяют в 900 мл воды. Если необходимо, доводят pH до 6,8 потенциометрически 0,1 М раствором хлористоводородной кислоты или 0,1 М раствором натрия гидроксида и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл.

Фосфатный буферный раствор pH 6,8

77,3 мл 71,5 г/л раствора динатрия гидрофосфата смешивают с 22,7 мл 21 г/л раствора лимонной кислоты.

Фосфатный буферный раствор pH 6,8 (1)

51,0 мл 27,2 г/л раствора калия дигидрофосфата смешивают с 49,0 мл 71,6 г/л раствора динатрия гидрофосфата. Если необходимо, доводят pH до 6,8 потенциометрически исходным раствором калия дигидрофосфата или динатрия гидрофосфата.

Хранят при температуре от 2 до 8 ºС.

1 М трис-гидрохлорида буферный раствор pH 6,8

60,6 г трис(гидроксиметил)аминометана растворяют в 400 мл воды, доводят pH до 6,8 потенциометрически с помощью хлористоводородной кислоты концентрированной и доводят объём раствора водой до 500,0 мл.

Малеатный буферный раствор pH 7,0

10,0 г натрия хлорида, 6,06 г трис(гидроксиметил)аминометана и 4,90 г малеинового ангидрида растворяют в 900,0 мл воды. Доводят pH до 7,0 потенциометрически с помощью 170 г/л раствора натрия гидроксида и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл.

Хранят при температуре от 2 до 8 ºС.

Фосфатный буферный раствор pH 7,0

82,4 мл 71,5 г/л раствора динатрия гидрофосфата смешивают с 17,6 мл 21 г/л раствора лимонной кислоты.

Фосфатный буферный раствор pH 7,0 (1)

250,0 мл 0,2 М раствора калия дигидрофосфата смешивают со 148,2 мл 8 г/л раствора натрия гидроксида. Если необходимо, доводят pH до 7,0 потенциометрически исходным раствором калия дигидрофосфата или натрия гидроксида и доводят объём раствора водой до 1000,0мл.

Фосфатный буферный раствор pH 7,0 (2)

50,0 мл 136 г/л раствора калия дигидрофосфата смешивают с 29,5 мл 1 М раствора натрия гидроксида, доводят объём раствора водой до 100,0 мл. Доводят pH до 7,0 потенциометрически исходным раствором калия дигидрофосфата или натрия гидроксида.

Фосфатный буферный раствор pH 7,0 (3)

5,0 г калия дигидрофосфата и 11,0 г дикалия гидрофосфата растворяют в 900,0 мл воды. Доводят pH до 7,0 потенциометрически с помощью фосфорной кислоты разведённой 10 % или раствора натрия гидроксида разведённого 8,5 % и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл.

Фосфатный буферный раствор pH 7,0 (4)

28,4 г динатрия гидрофосфата безводного и 18,2 г калия дигидрофосфата растворяют в воде и доводят объём раствора водой до 500,0 мл.

Фосфатный буферный раствор pH 7,0 (5)

28,4 г динатрия гидрофосфата безводного растворяют в 800,0 мл воды. Доводят pH до 7,0 потенциометрически с помощью 30 % раствора фосфорной кислоты и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл.

0,025 М фосфатный буферный раствор pH 7,0

1 объём 0,063 М фосфатного буфера pH 7,0 смешивают с 1,5 объёмами воды.

0,03 М фосфатный буферный раствор pH 7,0

5,2 г дикалия гидрофосфата растворяют в 900,0 мл воды. Доводят pH до 7,0 с помощью фосфорной кислоты концентрированной и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл.

0,063 М фосфатный буферный раствор pH 7,0

5,18 г динатрия гидрофосфата безводного и 3,65 г натрия дигидрофосфата моногидрата растворяют в 950,0 мл воды. Доводят pH до 7,0 потенциометрически с помощью фосфорной кислоты концентрированной и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл.

0,067 фосфатный буферный раствор pH 7,0

Раствор I. 0,908 г калия дигидрофосфата растворяют в воде и доводят объём раствора водой до 100,0 мл.

Раствор II. 2,38 г динатрия гидрофосфата растворяют в воде и доводят объём раствора водой до 100,0 мл.

38,9 мл раствора I смешивают с 61,1 мл раствора II; если необходимо, доводят pH до 7,0 потенциометрически раствором I или II.

0,1 М фосфатный буферный раствор pH 7,0

1,361 г калия дигидрофосфата растворяют в воде и доводят объём раствора водой до 100,0 мл. Доводят pH до 7,0 потенциометрически с помощью 35 г/л раствора динатрия гидрофосфата

Тетрабутиламмония буферный раствор pH 7,0

6,16 г аммония ацетата растворяют в смеси 15,0 мл 400 г/л раствора

тетрабутиламмония гидроксида и 185,0 мл воды. Если необходимо, доводят pH до 7,0 потенциометрически с помощью азотной кислоты концентрированной.

Буферный раствор pH 7,2

250,0 мл 0,2 М раствора калия дигидрофосфата смешивают с 175,0 мл 0,2 М раствора натрия гидроксида. Доводят pH до 7,2 потенциометрически 0,2 М раствором калия дигидрофосфата или 0,2 М раствором натрия гидроксида и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл.

Фосфатный буферный раствор pH 7,2

87,0 мл 71,5 г/л раствора динатрия гидрофосфата смешивают с 13,0 мл 21 г/л раствора лимонной кислоты.

Забуференный солевой раствор pH 7,2

8,0 г натрия хлорида, 0,2 г калия хлорида, 0,1 г кальция хлорида безводного, 0,1 г магния хлорида, 3,18 г динатрия гидрофосфата и 0,2 г калия дигидрофосфата растворяют в воде и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл.

Фосфатно-альбуминовый забуференный физиологический раствор pH 7,2

10,75 г динатрия гидрофосфата, 7,6 г натрия хлорида и 10,0 г альбумина бычьего растворяют в воде и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл. Непосредственно перед использованием доводят pH до 7,2 потенциометрически с помощью раствора натрия гидроксида разведённого 8,5 % или фосфорной кислоты разведённой 10 %.

Фосфатно–альбуминовый забуференный физиологический раствор pH 7,2 (1)

10,75 г динатрия гидрофосфата, 7,6 г натрия хлорида, 1,0 г альбумина бычьего растворяют в воде и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл. Непосредственно перед использованием доводят pH до 7,2 потенциометрически с помощью раствора натрия гидроксида разведённого 8,5 % или фосфорной кислоты разведённой 10 %.

Имидазольный буферный раствор pH 7,3

3,4 г имидазола и 5,8 г натрия хлорида растворяют в воде, приливают 18,6 мл

1 М раствора хлористоводородной кислоты и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл; если необходимо, доводят pH до 7,3 потенциометрически 1 М раствором хлористоводородной кислоты.

Буферный раствор pH 7,4

0,6 г калия дигидрофосфата, 6,4 г динатрия гидрофосфата и 5,85 г натрия хлорида растворяют в воде, если необходимо, доводят pH до 7,4 потенциометрически 0,1 М раствором хлористоводородной кислоты или 0,1 М раствором натрия гидроксида и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл.

Барбитал-буферный раствор pH 7,4

50,0 мл раствора, содержащего 19,44 г/л натрия ацетата и 29,46 г/л барбитал-натрия, смешивают с 50,5 мл 0,1 М раствора хлористоводородной кислоты, прибавляют 20,0 мл 85 г/л раствора натрия хлорида и доводят объём раствора водой до 250,0 мл.

Фосфатный буферный раствор pH 7,4

393,4 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида смешивают с 250,0 мл 0,2 М раствора калия дигидрофосфата.

Трис(гидроксиметил)аминометана – натрия хлорида буферный раствор pH 7,4

6,08 г трис(гидроксиметил)аминометана и 8,77 г натрия хлорида растворяют в 500 мл воды, прибавляют 10,0 г альбумина бычьего. Доводят pH до 7,4 потенциометрически с помощью хлористоводородной кислоты концентрированной и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл.

Трис - натрия ацетата буферный раствор pH 7,4

6,3 г трис(гидроксиметил)аминометана и 4,9 г натрия ацетата безводного растворяют в 900,0 мл воды. Доводят pH до 7,4 с помощью серной кислоты концентрированной и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл.

Трис – натрия ацетата – натрия хлорида буферный раствор pH 7,4

30,0 г трис(гидроксиметил)аминометана, 14,5 г натрия ацетата безводного, 14,6 г натрия хлорида растворяют в 900,0 мл воды и прибавляют 0,50 г альбумина бычьего. Доводят pH до 7,4 потенциометрически с помощью

серной кислоты концентрированной и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл.

Фосфатный забуференный физиологический раствор pH 7,4

2,38 г динатрия гидрофосфата, 0,19 г калия дигидрофосфата и 8,0 г натрия хлорида растворяют в воде, если необходимо, доводят pH до 7,4 потенциометрически 0,1 М раствором хлористоводородной кислоты или 0,1 М раствором натрия гидроксида и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл.

Боратный буферный раствор pH 7,5

2,5 г натрия хлорида, 2,85 г натрия тетрабората и 10,5 г борной кислоты растворяют в воде, если необходимо, доводят pH до 7,5 потенциометрически 0,1 М раствором хлористоводородной кислоты или 0,1 М раствором натрия гидроксида и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл.

Хранят при температуре от 2 до 8 ºС.

Буферный (HEPES) раствор pH 7,5

2,38 г 2-[4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-ил]этансульфоновой кислоты растворяют в 90 мл воды. Доводят pH до 7,5 потенциометрически с помощью 20 % раствора натрия гидроксида и доводят объём раствора водой до 100,0 мл.

0,2 М фосфатный буферный раствор pH 7,5

27,22 г калия дигидрофосфата растворяют в 930,0 мл воды. Доводят pH до 7,5 потенциометрически с помощью 300 г/л раствора калия гидроксида и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл.

0,33 М фосфатный буферный раствор pH 7,5

Раствор I. 119,31 г динатрия гидрофосфата растворяют в воде и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл.

Раствор II. 45,36 г калия дигидрофосфата растворяют в воде и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл.

85,0 мл раствора I смешивают с 15,0 мл раствора II; если необходимо, доводят pH до 7,5 потенциометрически раствором I или раствором II.

Трис(гидроксиметил)аминометана буферный раствор pH 7,5

7,27 г трис(гидроксиметил)аминометана и 5,27 г натрия хлорида растворяют в воде. Если необходимо, доводят pH до 7,5 потенциометрически исходным раствором трис(гидроксиметил)аминометана или 0,1 М раствором хлористоводородной кислоты и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл.

0,05 М трис – гидрохлорида буферный раствор pH 7,5

6,057 г трис(гидроксиметил)аминометана растворяют в воде. Если необходимо, доводят pH до 7,5 потенциометрически с помощью хлористоводородной кислоты концентрированной и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл.

Натрия цитрата буферный раствор pH 7,8 (0,034 М натрия цитрата и 0,101 М натрия хлорида раствор)

10,0 г натрия цитрата и 5,90 г натрия хлорида растворяют в 900,0 мл воды. Доводят pH до 7,8 потенциометрически с помощью хлористоводородной кислоты концентрированной и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл.

Буферный раствор pH 8,0

50,0 мл 0,2 М раствора калия дигидрофосфата смешивают с 46,8 мл 0,2 М раствора натрия гидроксида и доводят объём раствора водой до 200,0 мл.

Буферный раствор pH 8,0 (1)

20,0 г дикалия гидрофосфата растворяют в 900,0 мл воды. Доводят pH до 8,0 потенциометрически с помощью фосфорной кислоты концентрированной и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл.

0,0015 М боратный буферный раствор pH 8,0

0,572 г натрия тетрабората и 2,94 г кальция хлорида растворяют в 800,0 мл воды. Доводят pH до 8,0 с помощью 1 М раствора хлористоводородной кислоты и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл.

0,02 М фосфатный буферный раствор pH 8,0

50,0 мл 0,2 М раствора калия дигидрофосфата смешивают с 46,8 мл 0,2 М раствора натрия гидроксида и доводят объём раствора водой до 500,0 мл.

0,1 М фосфатный буферный раствор pH 8,0

0,523 г калия дигидрофосфата и 16,73 г дикалия гидрофосфата растворяют в

воде и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл.

1 М фосфатный буферный раствор pH 8,0

136,1 г калия дигидрофосфата растворяют в воде. Доводят pH до 8,0 потенциометрически с помощью 1 М раствора натрия гидроксида и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл.

Трис – натрия ацетатный буферный раствор pH 8,0

6,3 г трис(гидроксиметил)аминометана и 4,9 г натрия ацетата безводного растворяют в 900,0 мл воды. Доводят pH до 8,0 потенциометрически с помощью серной кислоты концентрированной и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл.

1 М трис – гидрохлоридный буферный раствор pH 8,0

121,1 г трис(гидроксиметил)аминометана и 1,47 г кальция хлорида растворяют в 900,0 мл воды. Доводят pH до 8,0 потенциометрически с помощью хлористоводородной кислоты концентрированной и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл.

Трис – гидрохлоридный буферный раствор pH 8,0

1,21 г трис(гидроксиметил)аминометана и 29,4 мг кальция хлорида растворяют в воде. Доводят pH до 8,0 потенциометрически с помощью 1 М раствора хлористоводородной кислоты и доводят объём раствора водой до 100,0 мл.

Трис(гидроксиметил)аминометана буферный раствор pH 8,1

0,294 г кальция хлорида растворяют в 40,0 мл раствора трис(гидроксиметил)аминометана 24,22 г/л. Доводят pH до 8,1 потенциометрически с помощью 1 М раствора хлористоводородной кислоты и доводят объём раствора водой до 100,0 мл.

Трис – глицина буферный раствор pH 8,3

6,0 г трис(гидроксиметил)аминометана и 28,8 г глицина растворяют в 500,0 мл воды и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл. Непосредственно перед использованием 1 объём приготовленного раствора доводят водой до 10 объёмов.

Барбитала буферный раствор pH 8,4

8,142 г барбитал-натрия и 0,287 г натрия ацетата растворяют в воде, добавляют 90,0 мл 0,1 М хлористоводородной кислоты и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл.

Трис – EDTA – BSA буферный раствор pH 8,4

6,1 г трис(гидроксиметил)аминометана, 2,8 г натрия эдетата, 10,2 г натрия хлорида и 10,0 г альбумина бычьего растворяют в воде. Доводят pH до 8,4 потенциометрически с помощью 1 М раствора хлористоводородной кислоты и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл.

Трис(гидроксиметил)аминометана – EDTA буферный раствор pH 8,4

5,12 г натрия хлорида, 3,03 г трис(гидроксиметил)аминометана и 1,40 г натрия эдетата растворяют в 250,0 мл воды. Доводят pH до 8,4 потенциометрически с помощью хлористоводородной кислоты концентрированной и доводят объём раствора водой до 500,0 мл.

Фосфатный буферный раствор pH 8,5

3,5 г дикалия гидрофосфата и 4,5 г натрия хлорида растворяют в 500,0 мл воды. Доводят pH до 8,5 потенциометрически с помощью смеси равных объёмов фосфорной кислоты разведённой 10 % и воды.

Трис – ацетатный буферный раствор pH 8,5

0,294 г кальция хлорида и 12,11 г трис(гидроксиметил)аминометана растворяют в воде. Доводят pH до 8,5 потенциометрически с помощью уксусной кислоты разведенной 30 % и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл.

Трис – боратный буферный раствор с трилоном Б pH 8,6 – 8,8

60,5 г трис(гидроксиметил)аминометана, 6,0 г трилона Б, 19,0 г борной кислоты последовательно растворяют в воде в мерном цилиндре вместимостью 1000,0 мл, доводят объём раствора водой до метки и перемешивают. При необходимости раствор фильтруют через бумажный фильтр. Раствор хранят при температуре 2 – 8 °С не более 3 мес.

1,5 М трис – гидрохлоридный буферный раствор pH 8,8

90,8 г трис(гидроксиметил)аминометана растворяют в 400 мл воды. Доводят pH до 8,8 потенциометрически с помощью хлористоводородной кислоты концентрированной и доводят объём раствора водой до 500,0 мл.

Буферный (фосфатный) раствор pH 9,0

1,74 г калия дигидрофосфата растворяют в 80 мл воды. Доводят pH до 9,0 потенциометрически с помощью 1 М раствора калия гидроксида и доводят объём раствора водой до 100,0 мл.

Буферный раствор pH 9,0

Раствор I. 6,18 г борной кислоты растворяют в 0,1 М растворе калия хлорида и доводят объём раствора тем же растворителем до 1000,0 мл.

Раствор II. 0,1 М раствор натрия гидроксида.

1000,0 мл раствора I смешивают с 420,0 мл раствора II.

Буферный раствор pH 9,0 (1)

6,20 г борной кислоты растворяют в 500,0 мл воды. Доводят pH до 9,0 потенциометрически с помощью 1 М раствора натрия гидроксида (около 41,5 мл) и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл.

Аммония хлорида буферный раствор pH 9,5

33,5 г аммония хлорида растворяют в 150,0 мл воды, прибавляют 42,0 мл раствора аммиака концентрированного 25% и доводят объём раствора водой до 250,0 мл. Хранят в полиэтиленовой упаковке.

Аммония хлорида буферный раствор pH 10,0

5,4 г аммония хлорида растворяют в 20,0 мл воды, приливают 35,0 мл раствора аммиака и доводят объём раствора водой до 100,0 мл.

Диэтаноламина буферный раствор pH 10,0

96,4 г диэтаноламина растворяют в воде, доводят объём раствора водой до 400,0 мл, прибавляют 0,5 мл 186 г/л раствора магния хлорида. Доводят pH до 10,0 потенциометрически с помощью 1 М раствора хлористоводородной кислоты и доводят объём раствора водой до 500,0 мл.

0,1 М аммония карбоната буферный раствор pH 10,3

7,91 г аммония карбоната растворяют в 800,0 мл воды. Доводят pH до 10,3

потенциометрически с помощью раствора натрия гидроксида разведённого 8,5 % и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл.

Аммония хлорида буферный раствор pH 10,4

70,0 г аммония хлорида растворяют в 200,0 мл воды, прибавляют 330,0 мл раствора аммиака концентрированного 25% и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл. Если необходимо, доводят pH до 10,4 потенциометрически с помощью раствора аммиака 17%.

Боратный буферный раствор 10,4

24,64 г борной кислоты растворяют в 900,0 мл воды. Доводят pH до 10,4 потенциометрически с помощью 400 г/л раствора натрия гидроксида и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл.

Буферный раствор pH 10,9

6,75 г аммония хлорида растворяют в растворе аммиака (см. ОФС «Реактивы. Индикаторы») и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл.

Буфер для регулирования ионной силы

58,5 г натрия хлорида, 57,0 мл уксусной кислоты ледяной, 61,5 г натрия ацетата и 5,0 г циклогексилендинитрилтетрауксусной кислоты растворяют в воде и доводят объём раствора водой до 500,0 мл. Доводят pH до 5,0 – 5,5 с помощью 335 г/л раствора натрия гидроксида и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл.

Буфер для регулирования ионной силы (1)

Раствор (а). 210,0 г лимонной кислоты растворяют в 400,0 мл воды. Доводят pH до 7,0 потенциометрически с помощью раствора аммиака концентрированного 25 % и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл.

Раствор (б). 132 г аммония фосфата растворяют в воде и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл.

Раствор (в). К суспензии 292,0 г (этилендинитрил)тетрауксусной кислоты в 500,0 мл воды прибавляют 200,0 мл раствора аммиака концентрированного 25%. Доводят pH до 6,0-7,0 потенциометрически с помощью раствора аммиака концентрированного 25% и доводят объём раствора водой до

1000,0 мл.

Смешивают равные объёмы растворов (а), (б), (в) и доводят pH до 7,5 с помощью раствора аммиака концентрированного 25 %.