

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ
НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ

«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
ИССЛЕДОВАНИЙ И РАЗРАБОТКИ
ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ
ПРЕПАРАТОВ ИМ. М.П. ЧУМАКОВА РАН»
(ИНСТИТУТ ПОЛИОМИЕЛИТА)
(ФГАНУ «ФНЦИРИП» им. М.П. Чумакова РАН»
(Институт полиомиелита))

Адрес юридического лица: улица Кржижановского, дом 29,
корпус 3, помещение 1, комната № 6, в.тер.г. муниципальный
округ Котловка, город Москва, 117218

Почтовый адрес: посёлок Института Полиомиелита, дом 8, корпус 1,
вн.тер.г. муниципальный округ Филimonковский,
город Москва, 108819

Тел./факс (495) 841-90-02; (495) 549-67-60
E-mail: sue_polio@chumakovs.ru; www.chumakovs.ru
ОКПО 01895045, ОГРН 1167746624847,
ИНН/КПП 7751023847/772701001

18.02.2026 № 18/9

Поставщикам (Исполнителям, Подрядчикам),
заинтересованным в поставке товара (выполнении
работ, оказании услуг)

Запрос о предоставлении коммерческих предложений

ФГАНУ «ФНЦИРИП» им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита) планирует проведение закупки на оказание услуг по проведению верификации методик анализа вспомогательных веществ для нужд ФГАНУ «ФНЦИРИП» им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита (далее –Услуга) в соответствии с Федеральным законом от 18.07.2011 № 223-ФЗ «О закупках товаров, работ, услуг отдельными видами юридических лиц» и Положением о закупке Федерального государственного автономного научного учреждения «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), утвержденном Наблюдательным советом Протоколом от 08.06.2021 № 01, с изменениями, утвержденными Протоколом от 03.08.2021 № 2, Протоколом от 27.05.2022 № 8, Протоколом от 16.09.2022 № 10, Протоколом от 30.03.2023 № 2, Протоколом от 27.06.2024 № 4, Протоколом от 18.09.2024 № 5, Протоколом от 20.12.2024 № 6, Протоколом от 28.03.2025 № 2, Протоколом от 26.06.2025 № 3 (далее – Положение о закупке).

Предполагаемые сроки проведения закупки: февраль-март 2026 года.

Просим предоставить информацию о стоимости оказания Услуг, указанных в Таблице № 1. Описание и технические характеристики Услуги представлены в Техническом задании (приложение № 1 к запросу о предоставлении коммерческих предложений).

Таблица № 1

Объект	Наименование методики анализа	Ед. изм.	Код ОКПД2	Предоставление национального режима (установление запрета/ограничений/преимуществ) ¹
Желатин	Железо	Усл. ед.	71.20.11.190	Не установлено
	Хром	Усл. ед.	71.20.11.190	Не установлено
	Цинк	Усл. ед.	71.20.11.190	Не установлено
Сахароза	Удельное оптическое вращение	Усл. ед.	71.20.11.190	Не установлено
	Интенсивность цвета	Усл. ед.	71.20.11.190	Не установлено
	Сульфиты	Усл. ед.	71.20.11.190	Не установлено
	Состав жирных кислот	Усл. ед.	71.20.11.190	Не установлено
	Кислотное число	Усл. ед.	71.20.11.190	Не установлено
Полисорбат 80	Гидроксильное число	Усл. ед.	71.20.11.190	Не установлено
	Пероксидное число	Усл. ед.	71.20.11.190	Не установлено
	Число омыления	Усл. ед.	71.20.11.190	Не установлено
	Вода	Усл. ед.	71.20.11.190	Не установлено
	Общая зола	Усл. ед.	71.20.11.190	Не установлено
Лактозы моногидрат	Удельное оптическое вращение	Усл. ед.	71.20.11.190	Не установлено
	Вода	Усл. ед.	71.20.11.190	Не установлено
	Сульфатная зола	Усл. ед.	71.20.11.190	Не установлено
Сорбигол	Подлинность	Усл. ед.	71.20.11.190	Не установлено

¹ Национальный режим предоставляется в соответствии со статьей 3.1-4 Федерального закона от 18.07.2011 № 223-ФЗ «О закупках товаров, работ, услуг отдельными видами юридических лиц» (далее – Федеральный закон № 223-ФЗ) и постановлением Правительства РФ от 23.12.2024 № 1875 «О мерах по предоставлению национального режима при осуществлении закупок товаров, работ, услуг для обеспечения государственных и муниципальных нужд, закупок товаров, работ, услуг отдельными видами юридических лиц» (далее – Постановление № 1875).

	Количественное определение	Усл. ед.	71.20.11.190	Не установлено
	Родственные примеси	Усл. ед.	71.20.11.190	Не установлено
	Количественное определение	Усл. ед.	71.20.11.190	Не установлено
	Вещества, дающие положительную реакцию на нингидрин и аммоний	Усл. ед.	71.20.11.190	Не установлено
	Удельное оптическое вращение	Усл. ед.	71.20.11.190	Не установлено
	Железо	Усл. ед.	71.20.11.190	Не установлено
	Сульфатная зола	Усл. ед.	71.20.11.190	Не установлено
	Вещества, дающие положительную реакцию на нингидрин и аммоний	Усл. ед.	71.20.11.190	Не установлено
	Удельное оптическое вращение	Усл. ед.	71.20.11.190	Не установлено
	Железо	Усл. ед.	71.20.11.190	Не установлено
	Сульфатная зола	Усл. ед.	71.20.11.190	Не установлено
	Температура плавления	Усл. ед.	71.20.11.190	Не установлено
	Родственные вещества	Усл. ед.	71.20.11.190	Не установлено
	Сульфатная зола	Усл. ед.	71.20.11.190	Не установлено
	Вещества, дающие положительную реакцию на нингидрин и аммоний	Усл. ед.	71.20.11.190	Не установлено
	Удельное оптическое вращение	Усл. ед.	71.20.11.190	Не установлено
	Железо	Усл. ед.	71.20.11.190	Не установлено
	Сульфатная зола	Усл. ед.	71.20.11.190	Не установлено
Аланин				
Гистидин				
Трометамол				
Гистидина гидрохлорида моногидрат				

Основные условия исполнения договора:

Место оказания Услуг: Адрес местонахождения Заказчика для оказания Услуг: 108819, Российская Федерация, г. Москва, вл.тер.г. муниципальный округ Филимонковский, поселок Института Полиомелита, дом 8, корпус 1, ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомелита). Место оказания Услуг: по адресу аккредитованной лаборатории Исполнителя.

Срок оказания Услуг: осуществляться по заявкам Заказчика в течение _____ (указать срок поставки) календарных дней со дня получения Исполнителем от Заказчика заявки на оказание услуг. Оказание услуг со дня заключения договора по 28 февраля 2027 года.

В стоимость Услуг включаются все расходы Исполнителя, в том числе причитающиеся Исполнителю вознаграждение; расходы по исполнению гарантийных обязательств, расходы на страхование, уплату таможенных пошлин, налогов и других обязательных платежей, связанные с исполнением обязательств и оказанием Услуг по Договору.

Порядок оплаты: Оплата осуществляется в безналичной форме за фактически оказанные Услуги в течение не более 7 (семи) рабочих дней с даты приемки оказанных Услуг и подписания Заказчиком Акта приемки товаров, работ, услуг (код формы 0510452) на основании полученного от Исполнителя/Подрядчика счета на оплату.

Сбор коммерческих предложений осуществляется с целью обоснования начальной (максимальной) цены договора, цены договора, цены договора, заключаемого с единственным поставщиком (исполнителем, подрядчиком), цены единицы товара, работы, услуги. В случае принятия Заказчиком решения о проведении закупки у единственного поставщика (подрядчика, исполнителя) - коммерческое предложение, направленное в ответ на настоящий запрос о предоставлении коммерческих предложений, признается заявкой, направляемой участником закупки Заказчику на участие в неконкурентной закупке.

Коммерческое предложение должно содержать расчет цены Работы/Услуги. В частности, из содержания коммерческого предложения должна однозначно определяться стоимость Работы/Услуги за единицу.

Коммерческое предложение должно содержать ссылку на дату и номер настоящего запроса о предоставлении коммерческих предложений.

Коммерческое предложение должно предоставляться по форме Таблицы № 2.

Таблица № 2

Объект	Наименование методики анализа	Описание, характеристики Работ/Услуг (могут быть представлены в виде приложения, отличающегося от характеристик, установленных Заказчиком)	Ед. изм.	Цена за ед. изм. (с указанием валюты, ставки НДС)	Итоговая стоимость (с указанием валюты, ставки НДС)	Срок выполнения Работ/оказания Услуг
Желатин	Железо		Усл. ед.			
	Хром		Усл. ед.			
	Цинк		Усл. ед.			
Сахароза	Удельное оптическое вращение		Усл. ед.			
	Интенсивность цвета		Усл. ед.			
	Сульфиты		Усл. ед.			
Полисорбат 80	Состав жирных кислот		Усл. ед.			
	Кислотное число		Усл. ед.			
	Гидроксильное число		Усл. ед.			
	Пероксидное число		Усл. ед.			
	Число омыления		Усл. ед.			

	Вода				Усл. ед.				
	Общая зола				Усл. ед.				
Лактозы моногидрат	Удельное оптическое вращение				Усл. ед.				
	Вода				Усл. ед.				
	Сульфатная зола				Усл. ед.				
Сорбитол	Подлинность				Усл. ед.				
	Количественное определение				Усл. ед.				
	Родственные примеси				Усл. ед.				
	Количественное определение вещества, дающие положительную реакцию на нингидрин и аммоний				Усл. ед.				
Аланин	Удельное оптическое вращение				Усл. ед.				
	Железо				Усл. ед.				
	Сульфатная зола				Усл. ед.				
Гистидин	Вещества, дающие положительную реакцию на нингидрин и аммоний				Усл. ед.				
	Удельное оптическое вращение				Усл. ед.				
	Железо				Усл. ед.				
	Сульфатная зола				Усл. ед.				
Трометамол	Температура плавления				Усл. ед.				
	Родственные вещества				Усл. ед.				
	Сульфатная зола				Усл. ед.				
Гистидина гидрохлорида моногидрат	Вещества, дающие положительную реакцию на нингидрин и аммоний				Усл. ед.				
	Удельное оптическое вращение				Усл. ед.				
	Железо				Усл. ед.				
	Сульфатная зола				Усл. ед.				

	Итого с учетом НДС, %	
--	-----------------------	--

Ответы должны быть поданы с «18» 02 2026 года по «16» 02 2026 года включительно по адресу: imto@chumakovs.su.

Участник закупки вправе предоставить информацию, отражение которой в Техническом задании и/или проекте договора было бы желательным.

Проведение данной процедуры сбора информации не влечёт за собой возникновения каких-либо обязательств со стороны Заказчика, настоящей запрос о предоставлении коммерческих предложений не является офертой или публичной офертой, направление его участнику или размещение на сайте не является закупкой и не влечет за собой обязанности Заказчика заключить договор.

При наличии технических ошибок и неточностей при описании Товара/Работы/Услуги просим сообщить Заказчику.

Первый заместитель генерального директора
ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН»
(Институт полиомиелита)


А.Ю. Афонин

приложение № 1 к запросу о предоставлении коммерческих предложений

Техническое задание

на оказание услуг по проведению верификации методик анализа вспомогательных веществ для нужд ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита)

1. Общие положения

1.1. Настоящее техническое задание определяет перечень, сроки и порядок оказания услуг по верификации методик анализа вспомогательных веществ - Трометамола, Сорбитола, Лактозы моногидрата, Гистидина гидрохлорида моногидрата, Гистидина, Аланина, Желатина, Полисорбата – 80, Сахарозы (далее по тексту - Вспомогательные вещества), по показателям качества и методам в соответствии с таблицей 1 (далее – Услуги) для нужд ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита) (далее – «Заказчик»).

1.2. Адрес местонахождения Заказчика для оказания Услуг: 108819, Российская Федерация, г. Москва, вн.тер.г. муниципальный округ Филимонковский, поселок Института Полиомиелита, дом 8, корпус 1, ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита).

1.3. Место оказания Услуг: по адресу аккредитованной лаборатории Исполнителя.

1.4. Срок оказания Услуг: со дня, следующего за днем заключения Договора по «28» февраля 2028 г. включительно. Оказание услуг осуществляется Исполнителем по заявкам, полученным от Заказчика.

1.5. В стоимость услуг включены: все расходы Исполнителя, в том числе причитающееся Исполнителю вознаграждение; расходы по исполнению гарантийных обязательств, расходы на страхование, уплату таможенных пошлин, налогов и других обязательных платежей, связанные с исполнением обязательств и оказанием Услуг по Договору.

2. Общие требования. Верификация методик испытания вспомогательных веществ, а именно - установление пригодности методик анализа вспомогательных веществ, указанных в таблице 1 п.3 Технического задания, включает в себя:

2.1. Разработку протоколов по верификации каждой методики анализа вспомогательных веществ по показателям, перечисленным в п. 3 настоящего технического задания, таблица 1. Протокол испытания должен содержать следующую информацию:

- состав верификационной группы;
- цель;
- описание объекта верификации;
- порядок работы в случае нарушений критериев приемлемости;
- описание процесса верификации (в том числе перечисление используемого оборудования, стандартных образцов, реактивов и материалов, описание процесса пробоподготовки, критерии пригодности системы, условия проведения испытаний, требования к оформлению результатов, описание параметров верификации);
- заключение;
- нормативные документы и литература, используемые в ходе проведения испытаний.

Протокол верификации может содержать дополнительные разделы по усмотрению исполнителя.

2.2. Проведение верификации методик анализа вспомогательных веществ по показателям, перечисленным в п. 3. настоящего технического задания, таблица 1, в соответствии с предоставленным Исполнителем планом-графиком и протоколом по верификации методик, согласно нормативным документам на каждую методику анализа указанным в п. 3 табл. 1 и описанию методик анализа.

2.3. Оформление отчета по верификации каждой методики анализа по показателям, перечисленным в п. 3 настоящего технического задания, таблица 1, отчет должен содержать:

- состав верификационной группы с указанием вида работ для каждого члена верификационной группы;
 - цель отчета;
 - наименование реактивов и материалов, использованных при проведении анализов, с указанием номеров серий и срока годности;
 - наименование использованного оборудования с указанием серийного или заводского номера, даты поверки (если применимо);
 - подробное описание методики анализа, которая подвергается верификации;
 - условия проведения испытания;
 - критерии пригодности системы;
 - параметры верификации;
 - оценку параметров верификации
 - заключение о соответствии параметров верификации критериям приемлемости, и пригодности методики и возможности воспроизведения методики в испытательной лаборатории;
 - нормативные документы и литература, используемая при проведении верификации методик анализа.
- Отчет по верификации может содержать дополнительные разделы по усмотрению исполнителя.
- 2.4.** Первичные данные должны быть предоставлены в полном объеме и включать результаты измерений (числовые значения, хроматограммы, гистограммы, фотограммы и прочее в зависимости от методики анализа), сведения об используемом оборудовании, программном обеспечении.

3. Объем выполняемых работ

Таблица 1. Перечень показателей и методик анализа, подлежащих верификации.

Объект	Наименование методики анализа	Реквизиты документа на валидируемую методику (нормативный документ)
Желатин	Железо	*Ph.Eur. 11.0 (Атомно-абсорбционная спектрометрия (2.2.23, метод II)
	Хром	Ph.Eur. 11.0 (Атомно-абсорбционная спектрометрия (2.2.23, метод II)

	Цинк	Ph.Eur. 11.0 (Атомно-абсорбционная спектрометрия (2.2.23), метод II)
Сахароза	Удельное оптическое вращение	Ph.Eur. 11.0 (2.2.7)
	Интенсивность цвета	Ph.Eur. 11.0 (2.2.25)
Полисорбат 80	Сульфиты	Ph.Eur. 11.0 (2.2.25)
	Состав жирных кислот	Ph.Eur. 11.0 (2.4.22 Метод С)
	Кислотное число	Ph.Eur. 11.0 (2.5.1)
	Гидроксильное число	Ph.Eur. 11.0 (2.5.3 Метод А)
	Пероксидное число	Ph.Eur. 11.0 (2.2.20)
	Число омыления	Ph.Eur. 11.0 (2.5.6)
	Вода	Ph.Eur. 11.0 (2.5.12)
	Общая зола	Ph.Eur. 11.0 (2.4.16)
	Удельное оптическое вращение	Ph.Eur. 11.0 (2.2.7)
	Вода	Ph.Eur. 11.0 (2.5.12)
Лактозы моногидрат	Сульфатная зола	Ph.Eur. 11.0 (2.4.14)
	Подлинность	Ph.Eur. 11.0 (2.2.29)
Сорбитол	Количественное определение	Ph.Eur. 11.0 (2.2.29)
	Родственные примеси	Ph.Eur. 11.0 (2.2.29)
Аланин	Количественное определение	Ph.Eur. 11.0 (2.2.20)
	Вещества, дающие положительную реакцию на нингидрин и аммоний	Ph.Eur. 11.0 (2.2.56 Метод D)
	Удельное оптическое вращение	Ph.Eur. 11.0 (2.2.7)
	Железо	Ph.Eur. 11.0 (2.4.9)
	Сульфатная зола	Ph.Eur. 11.0 (2.4.14)
	Вещества, дающие положительную реакцию на нингидрин и аммоний	Ph.Eur. 11.0 (2.2.56 Метод D)
Гистидин	Удельное оптическое вращение	Ph.Eur. 11.0 (2.2.7)
	Железо	Ph.Eur. 11.0 (2.4.9)
	Сульфатная зола	Ph.Eur. 11.0 (2.4.14)
	Температура плавления	Ph.Eur. 11.0 (2.2.14)
Трометамол	Родственные вещества	Ph.Eur. 11.0 (2.2.27)
	Сульфатная зола	Ph.Eur. 11.0 (2.4.14)

Гистидина гидрохлорида моногидрат	Вещества, дающие положительную реакцию на нингидрин и аммоний	Ph.Eur. 11.0 (2.2.56 Метод I)
	Удельное оптическое вращение	Ph.Eur. 11.0 (2.2.7)
	Железо	Ph.Eur. 11.0 (2.4.9)
	Сульфатная зола	Ph.Eur. 11.0 (2.4.14)

* Ph.Eur. 11.0 – Европейская Фармакопея издание 11.0.

4. Описание методик анализа, подлежащих верификации.

4.1. Сахароза

I) Удельное оптическое вращение (Ph.Eur. 11.0. 2.2.7. Оптическое вращение): от +66,3 до +67,0. 26,0 г испытуемого вещества растворяют в воде R и доводят объем раствора до 100,0 мл тем же растворителем.

Используемый поляриметр должен обеспечивать измерения с точностью до 0,01°. Шкалу обычно проверяют при помощи сертифицированных кварцевых пластинок. Линейность шкалы может быть проверена при помощи растворов сахарозы.

Методика. Определяют ноль поляриметра и угол вращения плоскости поляризации при длине волны линии D спектра натрия ($\lambda = 589,3$ нм) при температуре $(20 \pm 0,5)^\circ \text{C}$.

Измерения оптического вращения могут проводиться при других температурах только в тех случаях, если в частной статье указан способ учета температуры.

Определяют ноль прибора с закрытой трубкой; для жидкостей - с пустой трубкой;

для растворов твердых веществ - с трубкой, заполненной соответствующим растворителем.

Удельное оптическое вращение вычисляют по формулам, обозначая правое и левое вращение

соответственно (+) и (-).

Для жидкостей:

$$[\alpha_D^{20}] = \frac{\alpha}{l \cdot \rho_{20}}$$

Для веществ в растворе:

$$[\alpha_D^{20}] = \frac{1000\alpha}{l \cdot c}$$

где:

c - концентрация вещества в растворе, в г / л.

Содержание c или c » растворенного вещества, в г / л или процентах (м/м) соответственно, рассчитывают по формулам:

$$c = \frac{1000\alpha}{l[\alpha]_D^{20}} \quad \text{и} \quad c' = \frac{100\alpha}{l[\alpha]_D^{20} \cdot \rho_{20}}$$

где:

α - угол вращения, измеренный при температуре $(20 \pm 0,5)^\circ \text{C}$, в градусах;

l - длина полиариметрической трубки, в дециметрах;

ρ_{20} - плотность при температуре 20°C , в граммах на кубический сантиметр.

II) Интенсивность цвета (Ph.Енг. 11.0. 2.2.25): не более 45.

50,0 г испытуемого вещества растворяют в 50,0 мл воды R. Смешивают, фильтруют (диаметр пор 0,45 мкм) и дегазируют. Измеряют оптическую плотность (2.2.25 Абсорбционная спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях) при длине волны 420 нм в кювете с длиной оптического пути не менее 4 см (желательно 10 см или более). Интенсивность цвета рассчитывают по следующей формуле:

$$\frac{A \times 1000}{b \times c} \quad \text{где,}$$

A - оптическая плотность, измеренная при длине волны 420 нм;

b - ширина кюветы в сантиметрах;

c- концентрация раствора, в граммах на миллилитр, рассчитанная по коэффициенту преломления (2.2.6 Показатель преломления) раствора, используют таблицу и при необходимости проводят интерполяцию значений.

n_D^{20}	c (g/mL)
1.4138	0.570
1.4159	0.585
1.4179	0.600
1.4200	0.615
1.4221	0.630
1.4243	0.645
1.4264	0.661

Пригодность хроматографической системы:

- сходимость: абсолютная разница между 2 значениями не должна превышать 3.

Ш) Сульфиты (Ph.Eur. 11.0. 2.2.25): не более 10 ppm, в пересчете на SO₂.

Содержание сульфитов определяют с помощью пригодного ферментативного метода, основанного на следующих реакциях. Сульфиты окисляются сульфитоксидазой до сульфатов и водорода пероксида, который далее восстанавливается никотинамидадениндинуклеотидпероксидазой в присутствии восстановленного никотинамидадениндинуклеотида (NADH). Количество окисленного NADH пропорционально содержанию сульфитов.

Испытуемый раствор. 4,0 г испытуемого вещества растворяют в свежеприготовленной воде дистиллированной R и доводят объем раствора до 10,0 мл тем же растворителем.

Стандартный раствор. 4,0 г испытуемого вещества растворяют в свежеприготовленной воде дистиллированной R, прибавляют 0,5 мл сульфита эталонного раствора (80 ppm SO₂) R и доводят объем раствора до 10,0 мл свежеприготовленной водой дистиллированной R.

Контрольный раствор. Свежеприготовленный раствор воды дистиллированной R.

По отдельности вносят по 2,0 мл испытуемого раствора, стандартного раствора и контрольного раствора в кюветы шириной 10 мм и прибавляют реактивы, как описано в наборе реактивов для определения сульфитов. Измеряют оптическую плотность (2.2.25 Абсорбционная спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях) при максимуме поглощения при длине волны около 340 нм перед и в конце реакции и вычитают из полученного значения значение оптической плотности контрольного раствора.

Разность оптических плотностей испытуемого раствора не должна составлять более половины разности оптических плотностей стандартного раствора.

4.2. Сорбитол

- I) Количественное определение** (Ph.Eur. 11.0. 2.2.29 Жидкостная хроматография): от 97,0 до 102,0 % в пересчете на безводное вещество.
Видимая проба: испытуемый раствор и стандартный раствор (а). Процентное содержание сорбитола рассчитывают с учетом заявленного содержания сорбитола CRS.
- II) Подлинность** (Ph.Eur. 11.0. 2.2.29 Жидкостная хроматография): основной пик на хроматограмме испытуемого раствора должен совпадать по времени удерживания и размеру с основным пиком на хроматограмме стандартного раствора (а). Изучают хроматограммы, полученные при количественном определении.
- III) Родственные вещества** (Ph.Eur. 11.0. 2.2.29 Жидкостная хроматография):
- любая примесь: площадь пика каждой примеси не должна превышать площадь основного пика на хроматограмме основного раствора (b) (0,2 %);
 - сумма примесей: не более 1,5-кратной площади основного пика на хроматограмме основного раствора (b) (3 %);
 - неучитываемые примеси: пики площадью не более площади основного пика на хроматограмме основного раствора (c) (0,1 %).
- Испытуемый раствор.* 5,0 г испытуемого вещества растворяют в 20 мл воды R и доводят объем раствора до 100,0 мл тем же растворителем.
- Стандартный раствор (а).* 0,50 г сорбитола CRS растворяют в 2 мл воды R и доводят объем раствора до 10,0 мл тем же растворителем.
- Стандартный раствор (b).* Доводят 2,0 мл испытуемого раствора до 100,0 мл водой R.
- Стандартный раствор (c).* Доводят 5,0 мл стандартного раствора (b) до 100,0 мл водой R.
- Стандартный раствор (d).* 0,5 г сорбитола R и 0,5 г маннитола R (примесь A) растворяют в 5 мл воды R и доводят объем раствора до 10,0 мл тем же растворителем.

Колонка:

- размер: длина - 0,3 м, диаметр - 7,8 мм;

- наполнитель: смола катионообменная сильнокислотная (кальциевая форма) R (9 мкм);

- температура: $(85 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

Подвижная фаза: дегазированная вода R.

Скорость потока: 0,5 мл/мин.

Детектирование: рефрактометрический детектор при постоянной температуре

Вводимая проба: 20 мкл испытуемого раствора и стандартных растворов (b), (c) и (d).

Длительность хроматографирования: 3-кратное время удерживания сорбитола.

Относительное время удерживания по пику сорбитола (время удерживания - около 27 мин): примесь С - около 0,6; примесь А - около 0,8; примесь В - около 1,1.

Пригодность хроматографической системы: стандартный раствор (d):

- разрешение: не менее 2 между пиками примеси А и сорбитола.

4.3. Трометамол

Г) Родственные вещества (Ph.Eur. 11.0. 2.2.27 Тонкослойная хроматография): любое пятно на хроматограмме испытуемого раствора (a), кроме основного пятна, не должно быть более интенсивным, чем пятно на хроматограмме стандартного раствора (b) (1,0 %). Дополнительное пятно (пятна) на хроматограмме испытуемого раствора, сравнивают визуально с соответствующим пятном (пятнами) на хроматограмме стандартного раствора, содержащего примесь (примеси) или с пятном на хроматограмме раствора сравнения, приготовленного из разбавления испытуемого раствора.

В качестве сорбента используют силикагель G R. Перед нанесением проб пластинку промывают метанолом R.

Испытуемый раствор (a). 0,20 г испытуемого вещества растворяют в 1 мл воды R при нагревании и доводят объем раствора до 10 мл метанолом R.

Испытуемый раствор (b). Доводят 1 мл испытуемого раствора (a) до 10 мл метанолом R.

Стандартный раствор (a). 20 мг трометамола CRS растворяют в метаноле R и доводят объем раствора до 10 мл тем же растворителем.

Стандартный раствор (b). Доводят 1 мл испытуемого раствора (a) до 100 мл метанолом R.

На линию старта наносят 10 мкл каждого раствора. Пластинку помещают в хроматографическую камеру со смесью растворителей 10 объемных частей аммиака раствора разведенного R1 и 90 объемных частей 2-пропанола R. Когда фронт растворителей пройдет расстояние 10 см, пластинку вынимают и сушат при температуре от 100 до 105 °С. Пластинку опрыскивают 5 г/л раствором калия перманганата R в 10 г/л растворе натрия карбоната R. Через приблизительно 10 минут пластинку исследуют при дневном освещении.

II) Температура плавления (Ph.Eur. 11.0. 2.2.14 Температура плавления-капиллярный метод): от 168 до 174 °С.

Тонкоизмельченное в порошок вещество сушат под вакуумом над силикагелем безводным R в течение 24 часов. Достаточное количество вещества помещают в капилляр до получения уплотненного столбика высотой от 4 до 6 мм. Повышают температуру бани приблизительно на 10 °С ниже предполагаемой температуры плавления и затем продолжают нагревание со скоростью около 1 °С в минуту. Когда температура достигнет значения на 5 °С ниже предполагаемой температуры плавления, помещают капилляр с веществом в прибор. Капилляр погружают в баню

так, чтобы его запаянный конец находился на уровне центра ртутного шарика термометра, метка погружения которого находится на уровне поверхности жидкости.

Отмечают температуру, при которой последняя твердая частичка перейдет в жидкую фазу.

III Сульфатная зола (Ph.Eur. 11.0. 2.4.14. Сульфатная зола) не более 0,1 %.

Определяют в 1,0 г испытуемого вещества. В течение 30 мин прокаливают при $(600 \pm 50)^\circ\text{C}$ подходящий тигель (например, платиновый, фарфоровый или кварцевый), охлаждают в эксикаторе над слоем силикагеля или другого соответствующего влагопоглотителя и взвешивают. 1,0 г испытуемого вещества помещают в тигель и взвешивают. Испытуемое вещество смачивают небольшим серной кислоты R (обычно 1 мл), осторожно нагревают при температуре, как можно более низкой, чтобы образец полностью обуглился. После охлаждения остаток смачивают небольшим количеством серной кислоты R (обычно 1 мл), осторожно нагревают до прекращения выделения белых паров и прокаливают при $(600 \pm 50)^\circ\text{C}$ до тех пор, пока остаток полностью не превратится в золу. Необходимо обеспечить отсутствие пламени во время проведения процедуры. Тигель охлаждают в эксикаторе над силикагелем или другим соответствующим влагопоглотителем, взвешивают и снова рассчитывают процент остатка.

Если содержание полученного таким образом остатка превышает предел, указанный в частной статье, остаток вновь смачивают серной кислотой R и сжигают, как описано выше, в течение 30 минутных периодов до тех пор, пока 2 последовательно взятые навески не будут отличаться друг от друга более чем на 0,5 мг или процентное содержание остатка не совпадет с указанным пределом. Количество вещества, используемого для испытания (обычно 1-2г), выбирается таким образом, чтобы указанный предел массы остатка (обычно около 1 мг) можно было измерить с достаточной точностью.

4.4. Лактозы моногидрат

D Удельное оптическое вращение (Ph.Eur. 11.0. 2.2.7 Оптическое вращение): от +54,4 до +55,9 (в пересчете на безводное вещество).

10,0 г испытуемого вещества растворяют в 80 мл воды R, нагревают до температуры 50°C . Дают охладиться и прибавляют 0,2 мл аммиака раствора разведенного R1. Выдерживают в течение 30 минут и доводят объем раствора до 100,0 мл водой R.

Используемый поляриметр должен обеспечивать измерения с точностью до $0,01^\circ$. Шкалу обычно проверяют при помощи сертифицированных кварцевых пластинок. Линейность шкалы может быть проверена при помощи растворов сахарозы.

Методика. Определяют ноль поляриметра и угол вращения плоскости поляризации при длине волны линии D спектра натрия ($\lambda = 589,3 \text{ нм}$) при температуре $(20 \pm 0,5)^\circ\text{C}$.

Измерения оптического вращения могут проводиться при других температурах только в тех случаях, если в частной статье указан способ учета температуры.

Определяют ноль прибора с закрытой трубкой; для жидкостей - с пустой трубкой;

для растворов твердых веществ - с трубкой, заполненной соответствующим растворителем.

Удельное оптическое вращение вычисляются по формулам, обозначающая правое и левое вращение соответственно (+) и (-).

Для жидкостей:

$$[\alpha_D^{20}] = \frac{\alpha}{l \cdot \rho_{20}}$$

Для веществ в растворе:

$$[\alpha_D^{20}] = \frac{1000\alpha}{l \cdot c}$$

где:

c - концентрация вещества в растворе, в г / л.

Содержание с или с » растворенного вещества, в г / л или процентах (м/м) соответственно, рассчитывают по формулам:

$$c = \frac{1000\alpha}{l[\alpha]_D^{20}} \quad \text{И} \quad c' = \frac{100\alpha}{l \cdot [\alpha]_D^{20} \cdot \rho_{20}}$$

где: α - угол вращения, измеренный при температуре $(20 \pm 0,5)^\circ \text{C}$, в градусах ;

l - длина поляризметрической трубки, в дециметрах;

ρ_{20} - плотность при температуре 20°C , в граммах на кубический сантиметр.

II) Сульфатная зола (Ph.Енг. 11.0. 2.4.14. Сульфатная зола) не более 0,1 %.
 Определяют в 1,0 г испытуемого вещества. В течение 30 мин прокаливают при $(600 \pm 50)^\circ \text{C}$ подходящий тигель (например, платиновый, фарфоровый или кварцевый), охлаждают в эксикаторе над слоем силикагеля или другого соответствующего влагопоглощающего вещества и взвешивают. 1,0 г испытуемого вещества помещают в тигель и взвешивают. Испытуемое вещество смачивают полностью обуглился. После охлаждения небольшим количеством серной кислоты R (обычно 1 мл), осторожно нагревают до прекращения выделения белых паров и прокаливают при $(600 \pm 50)^\circ \text{C}$ до тех пор, пока остаток полностью не превратится в золу. Необходимо обеспечить отсутствие пламени во время проведения процедуры. Тигель охлаждают в эксикаторе над силикагелем или другим соответствующим влагопоглостителем, взвешивают и снова рассчитывают процент остатка.

Если содержание полученного таким образом остатка превышает предел, указанный в частной статье, остаток вновь смачивают серной кислотой R и сжигают, как описано выше, в течение 30 минутных периодов до тех пор, пока 2 последовательно взятые навески не будут отличаться друг от друга более чем на 0,5 мг или процентное содержание остатка не совпадет с указанным пределом. Количество вещества, используемого для испытания (обычно 1-2г), выбирается таким образом, чтобы указанный предел массы остатка (обычно около 1 мг) можно было измерить с достаточной точностью.

III) Вода (Ph.Eur. 11.0. 2.5.12 Вода: полумикрометод): от 4,5 % до 5,5 %.

Определяют в 0,50 г испытуемого вещества, используя в качестве растворителя смесь 1 объемной части формамида R и 2 объемных частей метанола R.

Полумикроопределение воды основано на количественной реакции воды с серы диоксидом и йодом в соответствующей безводной среде в присутствии основания с подходящей буферной емкостью.

Прибор

Прибор состоит из сосуда для титрования с:

- 2 одинаковыми платиновыми электродами;
 - непроницаемыми впускными отверстиями для подвода растворителя и титранта;
 - впускными отверстиями для подачи воздуха через осушитель;
 - подходящим впускным отверстием для образца с пробкой или, для жидкостей, с прокладкой.
 - Системы впускных отверстий подходят также для подвода сухого азота или для распыления растворителей.
- Титрование выполняют согласно инструкциям, прилагаемым к оборудованию. В ходе испытания необходимо во всех отношениях обеспечивать защиту реагентов и растворителей от атмосферной влаги. Конечную точку титрования определяют, используя 2 одинаковых индикаторных электрода, подключенных к источнику электричества, таким образом, чтобы между электродами проходил постоянный ток (2.2.65. Вольтамперметрическое титрование) или поддерживалось постоянное напряжение (2.2.19. Амперометрическое титрование).

При прямом титровании используют (метод А). Добавление титранта обеспечивается либо уменьшением напряжения постоянного тока, либо увеличением силы тока при постоянном напряжении до тех пор, пока не наступит конечная точка титрования. Обычно используют оборудование с автоматическим определением конечной точки титрования. Проверка пригодности прибора может проводиться с использованием подходящего сертифицированного стандартного материала (например, амоксциллина тригидрата для проверки пригодности системы CRS). Стандартизация. В сосуд для титрования прибавляют метанол R, при необходимости высушенный, или растворитель, рекомендованный при замене титранта.

Используют приспособления для прибора для удаления остаточной воды из измеряемой кюветы, либо выполняют предварительное титрование. Помещают подходящее количество воды в предназначенную форму (вода R или стандартный образец) и титруют, перемешивая в течение необходимого времени. Эквивалент воды должен быть не менее 80% от указанного производителем.

Титрант стандартизируют перед первым использованием и затем через подходящие интервалы времени.

Если нет других указаний в частной статье, используют Метод А.

Метод А. В сосуд для титрования помещают метанол R, или растворитель, указанный в частной статье или рекомендованный заменитель титранта. Используют приспособления для прибора для удаления остаточной воды из измеряемой кюветы, либо выполняют предварительное титрование. Быстро помешают испытуемое вещество и выполняют титрование, перемешивая в течение времени, необходимого для экстракции.

Метод В. В сосуд для титрования помещают метанол R, или растворитель, указанный в частной статье, или титрант, рекомендуемый производителем. Используют приспособления для прибора для удаления остаточной воды из измеряемой кюветы, либо выполняют предварительное титрование. Испытуемое вещество, достаточно измельченное, быстро помещают в сосуд для титрования. Прибавляют точно измеренный объем титранта, взятый в избытке приблизительно на 1 мл или объем, указанный в частной статье. Оставляют стоять в защищенном от света месте в течение 1 минуты или на время, указанное в частной статье, периодически перемешивая содержимое сосуда. Избыток реагента титруют, используя метанол R или растворитель, указанный в частной статье, содержащий точно известное количество воды.

Пригодность системы. Точность определения с выбранным титрантом должна быть подтверждена для каждой комбинации испытуемого вещества, титранта и растворителя. Следующая методика, данная в качестве примера, пригодна для образцов, содержащих 2,5-25 мг воды.

Содержание воды в испытуемом веществе определяют, используя реактив/выбранную систему растворителей. Соответственно, в тот же самый сосуд для титрования последовательно прибавляют в подходящей форме известные количества воды R (по крайней мере, 5 добавлений), соответствующие 50-100% от её содержания в испытуемом веществе определяют содержание воды после каждого добавления. Рассчитывают процент открываемости (г) после каждого добавления, используя следующую формулу:

$$r = 100 \frac{W_2}{W_1}$$

W_1 = добавленное количество воды в миллиграммах;

W_2 = найденное количество воды в миллиграммах.

Рассчитывают процент среднего открываемости (recovery) (г). Реактив/система растворителей считается приемлемой, если (г) лежит в интервале от 97,5% до 102,5%

Строят линию регрессии.

На оси x откладывают совокупное количество добавленной воды, на оси y – сумму начального содержания воды, определенной в веществе (M), и совокупного количества воды, определенного после каждого добавления. Рассчитывают наклон (b), пересечение с осью y (a) и пересечение экстраполированной калибровочной кривой с осью x (d). Рассчитывают ошибку в процентах (e_1 и e_2), используя следующие формулы:

$$e_1 = 100 \frac{a - M}{M}$$

$$e_2 = 100 \frac{|d| - M}{M}$$

a = пересечение с осью y , в миллиграммах воды;

d = пересечение с осью x , в миллиграммах воды;

M = содержание воды в испытуемом веществе, в миллиграммах.

Реактив / система растворителей считается пригодной, если:

$-|e_1|$ и $|e_2|$ не более 2,5%;

b лежит в интервале 0,975 – 1,025.

4.5. Аланин

I) Количественное определение (Ph.Еur. 11.0. 2.2.20 Потенциометрическое титрование): от 98,5 до 101,0 % в пересчете на сухое вещество.

80,0 мг испытуемого вещества растворяют в 3 мл муравьиной кислоты безводной R. Прибавляют 20 мл уксусной кислоты безводной R. Титруют 0,1M раствором хлорной кислоты, определяя конечную точку титрования потенциометрическим методом.

1 мл 0,1M раствора хлорной кислоты соответствует 8,91 мг $C_3H_7NO_2$.

Конечную точку потенциометрического титрования находят, измеряя электродвижущую силу (ЭДС) электродной пары (или индикаторный электрод и электрод сравнения или два индикаторных электрода), погруженной в испытуемый раствор, как функцию количества прибавленного титранга.

ЭДС обычно измеряют при нулевом или практически нулевом токе.

Прибор. Используемый прибор (простой потенциометр, электронное устройство) включает вольтметр с разрешением около милливольты. Выбор индикаторного электрода зависит от природы испытуемого вещества. Этот электрод может быть стеклянным или металлическим (например, платиновым, золотым, серебряным или ртутным). Электродом сравнения обычно служит каломельный или хлорсеребряный электрод.

Для кислотно-основного титрования, если нет других указаний в частной статье, используют систему стеклянного и каломельного электродов или стеклянного и хлорсеребряного электродов.

Методика. При потенциометрическом титровании слабых кислот или оснований с использованием неводных растворителей перед растворением испытуемого вещества, при необходимости, проводят либо холостой опыт, либо предварительно нейтрализуют смесь растворителей. При невозможности использования потенциометрического детектирования, смесь растворителей может быть предварительно нейтрализована путем титрования с использованием подходящего индикатора.

Строят график зависимости изменения ЭДС от количества прибавленного титранта, продолжая прибавлять титрант сверх предполагаемой точки эквивалентности.

Конечная точка титрования соответствует резкому изменению ЭДС.

II) Вещества, дающие положительную реакцию на нингидрин (Ph.Eur. 11.0. 2.2.56. Метод I. Аминокислотный анализ):

- любое вещество, дающее положительную реакцию на нингидрин: для каждой примеси максимум 0,10 %;

- сумма всех примесей: максимум 0,5 %;

- предел регистрации: 0,05 %.

Для анализа используют Метод I.

Концентрации испытуемого раствора и стандартных растворов могут быть подобраны в соответствии с чувствительностью используемого оборудования.

Раствор А: хлороводородная кислота разведенная R1 или буферный раствор для приготовления анализируемых растворов, подходящий для используемого оборудования.

Испытуемый раствор: 30,0 г испытуемого вещества растворяют в растворе А и доводят до 50,0 мл раствором А.

Стандартный раствор (а): 1,0 мл испытуемого раствора доводят до 100,0, мл раствором А. 2,0 мл этого раствора разводят до 10,0 мл раствором А.

Стандартный раствор (b): 30,0 мг пролина R растворяют в растворе А и доводят до 100,0 мл раствором А. 1,0 мл этого раствора доводят до 250,0 мл раствором А.

Стандартный раствор (с): 6,0 мл аммония эталонного раствора (100 ppm NH₄) доводят до 50,0 мл раствором А. 1,0 мл этого раствора доводят до 100,0 мл раствором А.

Стандартный раствор (d): 30 мг изолейцина R и 30 мг лейцина R раствора г в растворе A и доводят до 50,0 мл раствором A. 1,0 мл этого раствора доводят до 200,0 мл раствором A.

Контрольный раствор: раствор A.

Вводят подходящие, равные количества испытуемого, холостого и стандартных растворов в аминокислотный анализатор. Используют программу, предназначенную для определения физиологических аминокислот.

Пригодность хроматографической системы: стандартный раствор (d):

- разрешение: минимум 1,5 между пиками изолейцина и лейцина.

Расчет процентного содержания:

- для любого вещества, дающего положительную реакцию на нингидрин, которое было детектировано при 570 нм, используют концентрацию аланина в стандартном растворе (a);

- для любого вещества, дающего положительную реакцию на нингидрин, которое было детектировано при 440 нм, используют концентрацию пролина в стандартном растворе (b);

Если пик находится выше предела регистрации при обеих длинах волн, для количественной оценки используют результат, полученный при 570 нм.

МЕТОДИКА 1 – ПОСТКОЛОНОЧНАЯ ДЕРИВАТИЗАЦИЯ НИНГИДРИНОМ

Ионообменная хроматография с постколоночной дериватизацией нингидрином - один из самых широко распространенных методов, применяемых для количественного аминокислотного анализа. Как правило, для анализа более сложных физиологических образцов используется литиевая катионообменная система, а более быстрая натрий катионообменная система - для более простых аминокислотных смесей, полученных с белковыми гидролизатами (обычно содержащими 17 аминокислотных компонентов). Разделение аминокислот на ионообменной колонке обеспечивается комбинацией изменений pH и ионной силы катюна.

Для улучшения разделения часто применяется температурный градиент.

Когда аминокислота реагирует с нингидрином, продукт реакции окрашивается в характерный пурпурный или желтый цвет. Аминокислоты, за исключением иминокислот, дают пурпурную окраску и показывают максимум поглощения при длине волны 570 нм. Аминокислоты, например, пролин, дают желтую окраску и показывают максимум поглощения при длине волны 440 нм. Постколоночную реакцию между нингидрином и аминокислотой, элюируемой с колонки, регистрируют при длинах волн 440 и 570 нм, и получаемая хроматограмма используется для определения аминокислотного состава.

Считается, что предел обнаружения для большинства производных аминокислот равен 10 пМ и 50 пМ для пролина. Получают линейную зависимость в диапазоне концентраций от 20 до 500 пМ с коэффициентом корреляции превышающим 0,999. Чтобы получить надежные данные об аминокислотном составе с помощью этой методики, объем образца перед гидролизом должен быть более 1 мкл.

III) Удельное оптическое вращение (Ph.Eur. 11.0. 2.2.7 Оптическое вращение): от +13.5 до +15.5 (в пересчете на безводное вещество). 2,5 г испытуемого вещества растворяют в хлороводородной кислоте R1 и доводят объем раствора до 25,0 мл той же кислотой. Испызуемый поляриметр должен обеспечивать измерения с точностью до 0,01°. Шкалу обычно проверяют при помощи сертифицированных кварцевых пластинок. Линейность шкалы может быть проверена при помощи растворов сахарозы.

Методика. Определяют ноль поляриметра и угол вращения плоскости поляризации при длине волны линии D спектра натрия ($\lambda = 589,3 \text{ нм}$) при температуре $(20 \pm 0,5)^\circ \text{C}$.

Измерения оптического вращения могут проводиться при других температурах только в тех случаях, если в частной статье указан способ учета температуры.

Определяют ноль прибора с закрытой трубкой; для жидкостей - с пустой трубкой;

для растворов твердых веществ - с трубкой, заполненной соответствующим растворителем.

Удельное оптическое вращение вычисляют по формулам, обозначая правое и левое вращение

соответственно (+) и (-).

Для жидкостей:

$$[\alpha_D^{20}] = \frac{\alpha}{l \cdot \rho_{20}}$$

Для веществ в растворе:

$$[\alpha_D^{20}] = \frac{1000\alpha}{l \cdot c}$$

где:

c - концентрация вещества в растворе, в г / л .

Содержание с или с » растворенного вещества, в г / л или процентах (м/м) соответственно, рассчитывают по формулам:

$$c = \frac{1000\alpha}{l[\alpha]_D^{20}} \quad \text{И} \quad c' = \frac{100\alpha}{l \cdot [\alpha]_D^{20}} \cdot \rho_{20}$$

где: α — угол вращения, измеренный при температуре $(20 \pm 0,5)^\circ \text{C}$, в градусах;

l — длина поляриметрической трубки, в дециметрах;

ρ_{20} — плотность при температуре 20°C , в граммах на кубический сантиметр.

IV) Железо (Ph.Eur. 11.0. 2.4.9. Железо): максимум 10 ppm.

1,0 г испытуемого вещества помещают в делительную воронку, растворяют в 10 мл хлороводородной кислоты разведенной R. Встряхивают с тремя порциями метилизобутилкетона

R 1, каждый раз по 10,0 мл в течение 3 минут. К объединенным органическим слоям прибавляют 10,0 мл воды R и встряхивают в течение 3 минут. Для испытания используют водный слой.

Количество испытуемого вещества, указанное в частной статье, растворяют в воде R, доводят объем раствора водой R до 10 мл и перемешивают; или используют 10 мл раствора, указанного в частной статье. Прибавляют 2 мл раствора 200 г / л кислоты лимонной R и 0,1 мл тиогликолевой кислоты R. Перемешивают, подщелачивают аммиака раствором R, доводят объем раствора водой R до 20 мл. В этих же условиях готовят эталон, в качестве которого используют 10 мл железа (III) эталонного раствора (1 ppm Fe) R.

Через 5 мин розовая окраска испытуемого раствора не должна быть интенсивнее окраски эталонного раствора.

V) Сульфатная зола (Ph.Eur. 11.0. 2.4.14. Сульфатная зола): максимум 0,1 %.

Определяют в 1,0 г испытуемого вещества. В течение 30 мин прокаливают при $(600 \pm 50)^\circ \text{C}$ подходящий тигель (например, платиновый, фарфоровый или кварцевый), охлаждают в эксикаторе над слоем силикагеля или другого соответствующего влагопоглощающего вещества и взвешивают.

1,0 г испытуемого вещества помещают в тигель и взвешивают. Испытуемое вещество смачивают небольшим серной кислоты R (обычно 1 мл), осторожно нагревают при температуре, как можно более низкой, чтобы образец полностью обуглился. После охлаждения остаток смачивают небольшим количеством серной кислоты R (обычно 1 мл), осторожно нагревают до прекращения выделения белых паров и прокаливают при $(600 \pm 50)^\circ \text{C}$ до тех пор, пока остаток полностью не превратится в золу. Необходимо обеспечить отсутствие пламени во время проведения процедуры. Тигель охлаждают в эксикаторе над силикагелем или другим соответствующим влагопоглощающим веществом, взвешивают и снова рассчитывают процент остатка.

Если содержание полученного таким образом остатка превышает предел, указанный в частной статье, остаток вновь смачивают серной кислотой R и сжигают, как описано выше, в течение 30 минутных периодов до тех пор, пока 2 последовательно взятые навески не будут отличаться друг от друга

более чем на 0,5 мг или процентное содержание остатка не совпадает с указанным пределом. Количество вещества, используемого для испытания (обычно 1 – 2 г), выбирается таким образом, чтобы указанный предел массы остатка (обычно около 1 мг) можно было измерить с достаточной точностью.

4.6. Гистидин

И) Вещества, дающие положительную реакцию на нингидрин (Ph. Eur. 11.0. 2.2.56. Метод I. Аминокислотный анализ):

- любое вещество, дающее положительную реакцию на нингидрин: для каждой примеси не более 0,2 %;
- общее содержание примесей: не более 0,5 %;
- предел регистрации: 0,05 %.

Для анализа используют Метод I.

Концентрации испытуемого раствора и стандартных растворов могут быть подобраны в соответствии с чувствительностью используемого оборудования.

Раствор А: вода R или буферный раствор для приготовления анализируемых растворов, подходящий для используемого оборудования.

Испытуемый раствор: 30,0 г испытуемого вещества растворяют в растворе А и доводят до 50,0 мл раствором А.

Стандартный раствор (а): 1,0 мл испытуемого раствора доводят до 100,0, мл раствором А. 2,0 мл этого раствора разводят до 10,0 мл раствором А.

Стандартный раствор (b): 30,0 мг пролина R растворяют в растворе А и доводят до 100,0 мл раствором А. 1,0 мл этого раствора доводят до 250,0 мл раствором А.

Стандартный раствор (c): 6,0 мл аммония эталонного раствора (100 ppm NH₄) доводят до 50,0 мл раствором А. 1,0 мл этого раствора доводят до 100,0 мл раствором А.

Стандартный раствор (d): 30 мг изолейцина R и 30 мг лейцина R растворяют в растворе А и доводят до 50,0 мл раствором А. 1,0 мл этого раствора доводят до 200,0 мл раствором А.

Контрольный раствор: раствор А.

Вводят подходящие, равные количества испытуемого, холостого и стандартных растворов в аминокислотный анализатор. Используют программу, предназначенную для определения физиологических аминокислот.

Пригодность хроматографической системы: стандартный раствор (d):

- разрешение: не менее 1,5 между пиками изолейцина и лейцина.

Расчет процентного содержания:

- для любого вещества, дающего положительную реакцию на нингидрин, которое было детектировано при 570 нм, используют концентрацию гистидина в стандартном растворе (a);

- для любого вещества, дающего положительную реакцию на нингидрин, которое было детектировано при 440 нм, используют концентрацию пролина в стандартном растворе (b);

Если пик находится выше предела регистрации при обеих длинах волн, для количественной оценки используют результат, полученный при 570 нм.

МЕТОДИКА 1 – ПОСТКОЛОНОЧНАЯ ДЕРИВАТИЗАЦИЯ НИНГИДРИНОМ

Ионообменная хроматография с постколоночной дериватизацией нингидрином - один из самых широко распространенных методов, применяемых для количественного аминокислотного анализа. Как правило, для анализа более сложных физиологических образцов используется литиевая катионообменная система, а более быстрая натрий катионообменная система - для более простых аминокислотных смесей, полученных с белковыми гидролизатами (обычно содержащими 17 аминокислотных компонентов). Разделение аминокислот на ионообменной колонке обеспечивается комбинацией изменений pH и ионной силы катиона.

Для улучшения разделения часто применяется температурный градиент.

Когда аминокислота реагирует с нингидрином, продукт реакции окрашивается в характерный пурпурный или желтый цвет. Аминокислоты, за исключением иминокислот, дают пурпурную окраску и показывают максимум поглощения при длине волны 570 нм. Аминокислоты, например, пролин, дают желтую окраску и показывают максимум поглощения при длине волны 440 нм. Постколоночную реакцию между нингидрином и аминокислотой, элюируемой с колонки, регистрируют при длинах волн 440 и 570 нм, и получаемая хроматограмма используется для определения аминокислотного состава.

Считается, что предел обнаружения для большинства производных аминокислот равен 10 пМ и 50 пМ для пролина. Получают линейную зависимость в диапазоне концентраций от 20 до 500 пМ с коэффициентом корреляции превышающим 0,999. Чтобы получить надежные данные об аминокислотном составе с помощью этой методики, объем образца перед гидролизом должен быть более 1 мкл.

II) Удельное оптическое вращение (Ph.Eur. 11.0. 2.2.7 Оптическое вращение): от +11,4 до +12,4 (в пересчете на безводное вещество). 2,75 г испытуемого вещества растворяют в 12,0 мл хлороводородной кислоте R1 и доводят объем раствора до 25,0 мл водой R. Испытуемый поляриметр должен обеспечивать измерения с точностью до 0,01°. Шкалу обычно проверяют при помощи сертифицированных кварцевых пластинок. Линейность шкалы может быть проверена при помощи растворов сахарозы.

Методика. Определяют ноль поляриметра и угол вращения плоскости поляризации при длине волны линии D спектра натрия ($\lambda = 589,3$ нм.) при температуре $(20 \pm 0,5)^\circ \text{C}$.

Измерения оптического вращения могут проводиться при других температурах только в тех случаях, если в частной статье указан способ учета температуры.

Определяют ноль прибора с закрытой трубкой; для жидкостей - с пустой трубкой;

для растворов твердых веществ - с трубкой, заполненной соответствующим растворителем.

Удельное оптическое вращение вычисляют по формулам, обозначая правое и левое вращение

соответственно (+) и (-).

Для жидкостей:

$$[\alpha_D^{20}] = \frac{\alpha}{l \cdot \rho_{20}}$$

Для веществ в растворе:

$$[\alpha_D^{20}] = \frac{1000\alpha}{l \cdot c}$$

где:

c - концентрация вещества в растворе, в г / л.

Содержание с или с » растворенного вещества, в г / л или процентах (м/м) соответственно, рассчитывают по формулам:

$$c = \frac{1000\alpha}{l[\alpha_D^{20}]} \quad \text{и} \quad c' = \frac{100\alpha}{l[\alpha_D^{20}] \cdot \rho_{20}}$$

где: α - угол вращения, измеренный при температуре $(20 \pm 0,5)^\circ \text{C}$, в градусах;

l - длина поляриметрической трубки, в дециметрах;

ρ_{20} - плотность при температуре 20°C , в граммах на кубический сантиметр.

III Железо (Ph.Eur. 11.0. 2.4.9. Железо): максимум 10 ppm.

1,0 г испытуемого вещества помещают в делительную воронку, растворяют в 10 мл хлороводородной кислоты разведенной R. Встряхивают с тремя порциями метилизобутилкетона R 1, каждый раз по 10 мл в течение 3 минут. К объединенным органическим слоям прибавляют 10,0 мл воды R и встряхивают в течение 3 минут. Для испытания используют водный слой.

Количество испытуемого вещества, указанное в частной статье, растворяют в воде R, доводят объём раствора водой R до 10 мл и перемешивают; или используют 10 мл раствора, указанного в частной статье. Прибавляют 2 мл раствора 200 г / л кислоты лимонной R и 0,1 мл тиогликолевой кислоты R. Перемешивают, подщелачивают аммиака раствором R, доводят объём раствора водой R до 20 мл. В этих же условиях готовят эталон, в качестве которого используют 10 мл железа (III) эталонного раствора (1 ppm Fe) R.

Через 5 мин розовая окраска испытуемого раствора не должна быть интенсивнее окраски эталонного раствора.

IV) Сульфатная зола (Ph.Eur. 11.0. 2.4.14. Сульфатная зола) не более 0,1 %.
 Определяют в 1,0 г испытуемого вещества. В течение 30 мин прокалывают при $(600 \pm 50)^\circ \text{C}$ подходящий тигель (например, платиновый, фарфоровый или кварцевый), охлаждают в эксикаторе над слоем силикагеля или другого соответствующего влагопоглопителя и взвешивают. 1,0 г испытуемого вещества помещают в тигель и взвешивают. Испытуемое вещество смачивают небольшим количеством серной кислоты R (обычно 1 мл), осторожно нагревают при температуре, как можно более низкой, чтобы образец полностью обуглился. После охлаждения остаток смачивают небольшим количеством серной кислоты R (обычно 1 мл), осторожно нагревают до прекращения выделения белых паров и прокалывают при $(600 \pm 50)^\circ \text{C}$ до тех пор, пока остаток полностью не превратится в золу. Необходимо обеспечить отсутствие пламени во время проведения процедуры. Тигель охлаждают в эксикаторе над силикагелем или другим соответствующим влагопоглопителем, взвешивают и снова рассчитывают процент остатка.

Если содержание полученного таким образом остатка превышает предел, указанный в частной статье, остаток вновь смачивают серной кислотой R и сжигают, как описано выше, в течение 30 минутных периодов до тех пор, пока 2 последовательно взятые навески не будут отличаться друг от друга более чем на 0,5 мг или процентное содержание остатка не совпадет с указанным пределом. Количество вещества, используемого для испытания (обычно 1-2г), выбирается таким образом, чтобы указанный предел массы остатка (обычно около 1 мг) можно было измерить с достаточной точностью.

4.7. Гистидина гидрохлорида моногидрат

I) Вещества, дающие положительную реакцию на нингидрин (Ph.Eur. 11.0. 2.2.56. Метод I. Аминокислотный анализ):

- любое вещество, дающее положительную реакцию на нингидрин: для каждой примеси не более 0,2 %;

- общее содержание примесей: не более 0,5 %;

- предел регистрации: 0,05 %.

Для анализа используют Метод 1.

Концентрации испытуемого раствора и стандартных растворов могут быть подобраны в соответствии с чувствительностью используемого оборудования.

Раствор А: вода R или буферный раствор для приготовления анализируемых растворов, подходящий для используемого оборудования.

Испытуемый раствор: 30,0 г испытуемого вещества растворяют в растворе А и доводят до 50,0 мл раствором А.

Стандартный раствор (а): 1,0 мл испытуемого раствора доводят до 100,0, мл раствором А. 2,0 мл этого раствора разводят до 10,0 мл раствором А.

Стандартный раствор (b): 30,0 мг пролина R растворяют в растворе А и доводят до 100,0 мл раствором А. 1,0 мл этого раствора доводят до 250,0 мл раствором А.

Стандартный раствор (c): 6,0 мл аммония эталонного раствора (100 ppm NH_4) доводят до 50,0 мл раствором А. 1,0 мл этого раствора доводят до 100,0 мл раствором А.

Стандартный раствор (d): 30 мг изолейцина R и 30 мг лейцина R растворяют в растворе А и доводят до 50,0 мл раствором А. 1,0 мл этого раствора доводят до 200,0 мл раствором А.

Контрольный раствор: раствор А.

Вводят подходящие, равные количества испытуемого, холостого и стандартных растворов в аминокислотный анализатор. Используют программу, предназначенную для определения физиологических аминокислот.

Пригодность хроматографической системы: стандартный раствор (d):

- разрешение: не менее 1,5 между пиками изолейцина и лейцина.

Расчет процентного содержания:

- для любого вещества, дающего положительную реакцию на нингидрин, которое было детектировано при 570 нм, используют концентрацию гистидина в стандартном растворе (a);

- для любого вещества, дающего положительную реакцию на нингидрин, которое было детектировано при 440 нм, используют концентрацию пролина в стандартном растворе (b);

Если пик находится выше предела регистрации при обеих длинах волн, для количественной оценки используют результат, полученный при 570 нм.

МЕТОДИКА

1

ПОСТКОЛОНОЧНАЯ

ДЕРИВАТИЗАЦИЯ

НИНГИДРИНОМ

Ионообменная хроматография с постколоночной дериватизацией нингидрином - один из самых широко распространенных методов, применяемых для количественного аминокислотного анализа. Как правило, для анализа более сложных физиологических образцов используется литиевая катионообменная система, а более быстрая натрий катионообменная система - для более простых аминокислотных смесей, полученных с белковыми гидролизатами (обычно содержащими 17 аминокислотных компонентов). Разделение аминокислот на ионообменной колонке обеспечивается комбинацией изменений pH и ионной силы катиона.

Для улучшения разделения часто применяется температурный градиент.

Когда аминокислота реагирует с нингидрином, продукт реакции окрашивается в характерный пурпурный или желтый цвет. Аминокислоты, за исключением иминокислот, дают пурпурную окраску и показывают максимум поглощения при длине волны 570 нм. Аминокислоты, например, пролин, дают желтую окраску и показывают максимум поглощения при длине волны 440 нм. Постколоночную реакцию между нингидрином и аминокислотой, элюируемой с колонки, регистрируют при длинах волн 440 и 570 нм, и получаемая хроматограмма используется для определения аминокислотного состава.

Считается, что предел обнаружения для большинства производных аминокислот равен 10 пМ и 50 пМ для пролина. Получают линейную зависимость в диапазоне концентраций от 20 до 500 пМ с коэффициентом корреляции превышающим 0,999. Чтобы получить надежные данные об аминокислотном составе с помощью этой методики, объем образца перед гидролизом должен быть более 1 мкл.

II) Удельное оптическое вращение (Ph. Eur. 11.0. 2.2.7 Оптическое вращение): от +9,2 до +10,6 (в пересчете на безводное вещество).

2,75 г испытуемого вещества растворяют в 12,0 мл хлороводородной кислоты R1 и доводят объем раствора до 25,0 мл водой R.

Используемый поляриметр должен обеспечивать измерение с точностью до 0,01°. Шкалу обычно проверяют при помощи сертифицированных кварцевых пластинок. Линейность шкалы может быть проверена при помощи растворов сахарозы.

Методика. Определяют ноль поляриметра и угол вращения плоскости поляризации при длине волны линии D спектра натрия ($\lambda = 589,3$ нм) при температуре $(20 \pm 0,5)^\circ \text{C}$.

Измерения оптического вращения могут проводиться при других температурах только в тех случаях, если в частной статье указан способ учета температуры.

Определяют ноль прибора с закрытой трубкой; для жидкостей - с пустой трубкой;

для растворов твердых веществ - с трубкой, заполненной соответствующим растворителем.

Удельное оптическое вращение вычисляют по формулам, обозначая правое и левое вращение соответственно (+) и (-).

Для жидкостей:

$$[\alpha_D^{20}] = \frac{\alpha}{l \cdot \rho_{20}}$$

Для веществ в растворе:

$$[\alpha_D^{20}] = \frac{1000\alpha}{l \cdot c}$$

где:

c - концентрация вещества в растворе, в г / л .

Содержание с или c » растворенного вещества, в г / л или процентах (м/м) соответственно, рассчитывают по формулам:

$$c = \frac{1000\alpha}{l[\alpha]_D^{20}} \quad \text{И} \quad c' = \frac{100\alpha}{l[\alpha]_D^{20} \cdot \rho_{20}}$$

где: α - угол вращения, измеренный при температуре $(20 \pm 0,5)^\circ \text{C}$, в градусах ;

l - длина поляризметрической трубки, в дециметрах;

ρ_{20} - плотность при температуре 20°C , в граммах на кубический сантиметр.

III Железо (Ph.Eur. 11.0. 2.4.9. Железо): не более 10 ppm.

1,0 г испытуемого вещества помещают в делительную воронку, растворяют в 10 мл хлороводородной кислоты разведенной R. Встряхивают с тремя порциями метилизобутилкетона R 1, каждый раз по 10 мл в течение 3 минут. К объединенным органическим слоям прибавляют 10,0 мл воды R и встряхивают в течение 3 минут. Для испытания используют водный слой.

Количество испытуемого вещества, указанное в частной статье, растворяют в воде R, доводят объём раствора водой R до 10 мл и перемешивают; или используют 10 мл раствора, указанного в частной статье. Прибавляют 2 мл раствора 200 г / л кислоты лимонной R и 0,1 мл тиогликолевой кислоты R. Перемешивают, подщелачивают аммиака раствором R, доводят объём раствора водой R до 20 мл. В этих же условиях готовят эталон, в качестве которого используют 10 мл железа (III) эталонного раствора (1 ppm Fe) R.

Через 5 мин розовая окраска испытуемого раствора не должна быть интенсивнее окраски эталонного раствора.

IV Сульфатная зола (Ph.Eur. 11.0. 2.4.14. Сульфатная зола): не более 0,1 %.

Определяют в 1,0 г испытуемого вещества. В течение 30 мин прокаливают при $(600 \pm 50)^\circ\text{C}$ подходящий тигель (например, платиновый, фарфоровый или кварцевый), охлаждают в эксикаторе над слоем силикагеля или другого соответствующего влагопоглощающего и взвешивают. 1,0 г испытуемого вещества помещают в тигель и взвешивают. Испытуемое вещество смачивают серной кислоты R (обычно 1 мл), осторожно нагревают при температуре, как можно более низкой, чтобы образец полностью обуглился. После охлаждения остаток смачивают небольшим количеством серной кислоты R (обычно 1 мл), осторожно нагревают до прекращения выделения белых паров и прокаливают при $(600 \pm 50)^\circ\text{C}$ до тех пор, пока остаток полностью не превратится в золу. Необходимо обеспечить отсутствие пламени во время проведения процедуры. Тигель охлаждают в эксикаторе над силикагелем или другим соответствующим влагопоглощающим, взвешивают и снова рассчитывают процент остатка.

Если содержание полученного таким образом остатка превышает предел, указанный в частной статье, остаток вновь смачивают серной кислотой R и сжигают, как описано выше, в течение 30 минутных периодов до тех пор, пока 2 последовательно взятые навески не будут отличаться друг от друга более чем на 0,5 мг или процентное содержание остатка не совпадет с указанным пределом. Количество вещества, используемого для испытания (обычно 1-2г), выбирается таким образом, чтобы указанный предел массы остатка (обычно около 1 мг) можно было измерить с достаточной точностью.

4.8. Полисорбат 80

I) Состав жирных кислот (Ph.Eur. 11.0. 2.4.22. Определение посторонних жирных кислот в маслах методом газовой хроматографии. Метод C): состав жирных кислот: - миристиновая кислота не более 5,0 %;

- пальмитиновая кислота не более 16,0 %;

- пальмитолеиновая кислота не более 8,0 %;

- стеариновая кислота не более 6,0 %;
 - олеиновая кислота не менее 58,0 %;
 - линолевая кислота не более 18,0 %;
 - линоленовая кислота не более 4,0 %.
- Этот метод неприменим для масел, содержащих глицериды жирных кислот с эпокси-, гидротрекесинными, альдегидными, кетонными, циклопропиловыми и циклопропениловыми группами, сопряженными полиненасыщенными и ацетиленовыми компонентами из-за частичного или полного разрушения этих групп.

Используют калибровочную смесь веществ, указанную в таблице 2.4.22.-3.

Таблица 2.4.22.-3.

Смесь веществ	Состав (в процентах м/м)
Метилмиристат R	5
Метилпальмитат R	10
Метилстеарат R	15
Метиларахидат R	20
Метилолеат R	20
Метилэйкозаноат R	10
Метилбегенат R	10
Метиллигноннат R	10

Колонка:

- материал: кварцевое стекло;
 - размер: длина – 30 м, диаметр – 0,32 мм;
 - наполнитель: макрогол 20 000R(толщина пленки 0,5 мкм);
- Газ-носитель: гелий для хроматографии R.
 Линейная скорость: 50 см/с.

Температура:

	Время, мин	Температура, °С
Колонка	0 - 14 14 - 54	80 → 220 220
Инжектор		250
Детектор		250

Детектирование: пламенно-ионизационный детектор.

Вводимая проба: 1 мкл.

Испытуемый раствор. 0,10 г испытуемого вещества помещают в коническую колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 2 мл раствора 20 г/л натрия гидроксида R в метаноле R и кипятят с обратным холодильником в течение 30 мин. Затем через холодильник прибавляют 2,0 мл бора фторида раствора в метаноле R и кипятят еще 30 мин, после чего прибавляют через холодильник 4,0 мл гептана R и кипятят 5 мин. Охлаждают, прибавляют 10,0 мл натрия хлорида раствора насыщенного R, встряхивают в течение 15 с и прибавляют такой объем натрия хлорида раствора насыщенного R, чтобы верхний слой поднялся к горлу колбы. Отбирают 2,0 мл верхнего слоя, помещают в делительную воронку, промывают тремя порциями воды R, по 2 мл каждая, и высушивают над натрия сульфатом безводным R. Эталонные растворы сравнения, хроматографическая методика и оценка хроматограмм. Если в частной статье нет других указаний, поступают как указано в методе A.

II) Кислотное число (Ph.Eur. 11.0. 2.5.1. Кислотное число): не более 2,0.

5,0 г испытуемого вещества растворяют в 50 мл смеси растворителей.

Кислотным числом I_A, называют количество миллиграммов калия гидроксида, необходимое для нейтрализации свободных кислот, содержащихся в 1 г испытуемого вещества.

Около 10,00 г или указанную в частной статье навеску испытуемого вещества (m г) растворяют в 50 мл смеси равных объемов этилового спирта (96 %) R и петролейного эфира R3, предварительно нейтрализованной 0,1 M раствором калия гидроксида или 0,1 M раствором натрия гидроксида, если нет других указаний в частной статье, используя в качестве индикатора 0,5 мл фенолфталеина раствора R1. При необходимости, нагревают при температуре около 90 °С до полного растворения испытуемого вещества. Затем растворенное вещество титруют 0,1 M раствором калия гидроксида или 0,1 M раствором натрия гидроксида до появления розового окрашивания, исчезающего в течение 15 с (n мл титранта). В том случае, когда для улучшения растворения применялось нагревание, в процессе титрования поддерживают температуру около 90° С.

$$I_A = \frac{5.611n}{m}$$

III) Гидроксильное число (Ph.Енг. 11.0. 2.5.3. Гидроксильное число. Метод А): от 65 до 80.

Гидроксильным числом он называют количество миллиграммов калия гидроксида, необходимое для нейтрализации кислоты, связывающейся при ацилировании 1 г испытуемого вещества.

МЕТОД А

Навеску испытуемого вещества в соответствии с Таблицей 2.5.3.-1 (m г) помещают в колбу для ацилирования вместимостью 150 мл, снабженную воздушным холодильником, если нет других указаний в частной статье. Прибавляют объем уксусного ангидрида раствора К 1, указанный в Таблице 2.5.3.-1 и присоединяют воздушный холодильник.

Таблица 2.5.3.-1.

Предполагаемое значение I_{OH}	Навеска испытуемого вещества (г)	Объем ацетилирующего реагента (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

Колбу нагревают на водяной бане в течение 1 ч, поддерживая уровень воды в бане на 2,5 см выше уровня жидкости в колбе. Извлекают колбу из бани и позволяют остыть. Затем через верхний конец воздушного холодильника прибавляют 5 мл воды R. При помутнении к раствору прибавляют пиридин R до полного исчезновения мути, отмечая израсходованный объем. Колбу встряхивают, помещают в кипящую водяную баню на 10 мин. Затем колбу извлекают из водяной бани и охлаждают. Воздушный холодильник и стенки колбы промывают 5 мл спирта R, предварительно нейтрализованного фенолфталеином раствором R1. Титруют 0,5 М раствором калия гидроксида спиртовым, используя 0,2 мл фенолфталеина раствора R1 в качестве индикатора (n_1 мл 0,5 М раствора калия гидроксида спиртового). Параллельно проводят контрольный опыт при тех же условиях (n_2 мл 0,5 М раствора калия гидроксида спиртового).

$$I_{OH} = \frac{28.05 (n_2 - n_1)}{m} + I_A$$

IV) Пероксидное число (Ph.Енг. 11.0. 2.2.20.): не более 10,0. 10,0 г испытуемого вещества вносят в цилиндр вместимостью 100 мл и растворяют в 20 мл уксусной кислоты ледяной R. Прибавляют 1 мл калия йодида раствора насыщенного R, смешивают и выдерживают в течение 1 минуты. Прибавляют 50 мл воды, не содержащей углерода диоксида R и мешалку для магнитной мешалки.

Титруют 0,01 М раствором натрия тиосульфата, определяя конечную точку потенциометрическим методом (Ph.Енг. 2.2.20). Проводят контрольное титрование.

Определяют пероксидное число по следующей формуле:

$$\frac{(n_1 - n_2) \times M \times 1000}{m}$$

где

n_1 – объем 0,01 М раствора натрия тиосульфата, израсходованного на титрование испытуемого раствора, мл;

n_2 – объем 0,01 М раствора натрия тиосульфата, израсходованного на контрольное титрование, мл;

M – молярность раствора натрия тиосульфата, в моль/л;

m – масса испытуемого вещества, в г.

V) Число омыления (Ph.Енг. 11.0. 2.5.6. Число омыления): от 45 до 55.

Определяют в 4,0 г испытуемого вещества.

Используют 30,0 мл 0,5 М раствора калия гидроксида спиртового и перед проведением титрования доводят до объема 50 мл этанолом безводным R. Нагревают с обратным холодильником в течение 60 минут.

Числом омыления I_s называют количество миллиграммов калия гидроксида, необходимое для нейтрализации свободных кислот и омыления сложных эфиров, содержащихся в 1 г испытуемого вещества. Если нет других указаний в частной статье, для проведения испытания используют количества, указанные в Таблице 2.5.6.-1.

Таблица 2.5.6.-1

Предполагаемое значение I_s	Масса навески испытуемого вещества (г)
<3	20
От 3 до 10	От 15 до 15
От 10 до 40	От 8 до 12
От 40 до 60	От 5 до 8
От 60 до 100	От 3 до 5

От 100 до 200	От 2,5 до 3
От 200 до 300	От 1 до 2
От 300 до 400	От 0,5 до 1

Навеску испытуемого вещества (m г), указанную в частной статье, помещают в колбу из боросиликатного стекла вместимостью 250 мл, снабженную обратным холодильником. Прибавляют 25,0 мл 0,5 М раствора калия гидроксида спиртового и несколько стеклянных шариков. К колбе присоединяют обратный холодильник и нагревают в течение 30 мин, если нет других указаний в частной статье. Прибавляют 1 мл фенолфталеина раствора R1 и немедленно титруют (пока раствор горячий) 0,5 М раствором хлороводородной кислоты (n_1 мл 0,5 М раствора хлороводородной кислоты). Параллельно проводят контрольный опыт при тех же условиях n_2 , мл 0,5 М раствора хлороводородной кислоты).

$$I_s = \frac{28,05 (n_2 - n_1)}{m}$$

VI) Вода (Ph. Eur. 11.0. 2.5.12. Вода. Полумикрометод): не более 3,0 %.

Определяют в 1,0 г испытуемого вещества.

Полумикроопределение воды основано на количественной реакции воды с серы диоксидом и йодом в соответствующей безводной среде в присутствии основания с подходящей буферной емкостью.

Прибор

Прибор состоит из сосуда для титрования с:

- 2 одинаковыми платиновыми электродами;
- непроницаемыми выпускными отверстиями для подвода растворителя и титранта;
- выпускными отверстиями для подачи воздуха через осушитель;
- подходящим выпускным отверстием для образца с пробкой или, для жидкостей, с прокладкой.

Системы выпускных отверстий подходят также для подвода сухого азота или для распыления растворителей.

Титрование выполняют согласно инструкциям, прилагаемым к оборудованию. В ходе испытания необходимо во всех отношениях обеспечивать защиту реагентов и растворителей от атмосферной влаги. Конечную точку титрования определяют, используя 2 одинаковых индикаторных электрода, подключенных к источнику электричества, таким образом, чтобы между электродами проходил постоянный ток (2.2.65. Вольтамметрическое титрование) или поддерживалось постоянное напряжение (2.2.19. Амперометрическое титрование). При прямом титровании используют (метод А). Добавление титранта обеспечивается либо уменьшением напряжения постоянного тока, либо увеличением силы тока при постоянном напряжении до тех пор, пока не наступит конечная точка титрования. Обычно используют оборудование с автоматическим определением конечной точки титрования.

Проверка пригодности прибора может проводиться с использованием подходящего сертифицированного стандартного материала (например, амоксциллина тригидрата для проверки пригодности системы CRS).

Стандартизация. В сосуд для титрования прибавляют метанол R, при необходимости высушенный, или растворитель, рекомендованный при замене титранта. Используют приспособления для прибора для удаления остаточной воды из измеряемой кюветы, либо выполняют предварительное титрование. Помещают подходящее количество воды в предназначенную форму (вода R или стандартный образец) и титруют, перемешивая в течение необходимого времени. Эквивалент воды должен быть не менее 80% от указанного производителем.

Титрант стандартизируют перед первым использованием и затем через подходящие интервалы времени.

Если нет других указаний в частной статье, используют Метод А.

Метод А. В сосуд для титрования помещают метанол R, или растворитель, указанный в частной статье или рекомендованный заменитель титранта. Используют приспособления для прибора для удаления остаточной воды из измеряемой кюветы, либо выполняют предварительное титрование. Быстро помещают испытуемое вещество и выполняют титрование, перемешивая в течение времени, необходимого для экстракции.

Метод В. В сосуд для титрования помещают метанол R, или растворитель, указанный в частной статье, или титрант, рекомендуемый производителем. Используют приспособления для прибора для удаления остаточной воды из измеряемой кюветы, либо выполняют предварительное титрование. Испытуемое вещество, достаточно измельченное, быстро помещают в сосуд для титрования. Прибавляют точно измеренный объем титранта, взятый в избытке приблизительно на 1 мл или объем, указанный в частной статье. Оставляют стоять в защищенном от света месте в течение 1 минуты или на время, указанное в частной статье, периодически перемешивая содержимое сосуда. Избыток реагента титруют, используя метанол R или растворитель, указанный в частной статье, содержащий точно известное количество воды.

Пригодность системы. Точность определения с выбранным титрантом должна быть подтверждена для каждой комбинации испытуемого вещества, титранта и растворителя. Следующая методика, данная в качестве примера, пригодна для образцов, содержащих 2,5-25 мг воды.

Содержание воды в испытуемом веществе определяют, используя реактив / выбранную систему растворителей. Соответственно, в тот же самый сосуд для титрования последовательно прибавляют в подходящей форме известные количества воды R (по крайней мере, 5 добавлений), соответствующие 50-100% от её содержания в испытуемом веществе определяют содержание воды после каждого добавления. Рассчитывают процент открываемости (r) после каждого добавления, используя следующую формулу:

$$r = 100 \frac{W_2}{W_1}$$

W_1 = добавленное количество воды в миллиграммах;

W_2 = найденное количество воды в миллиграммах.

Рассчитывают процент среднего открываемости (rescovery) (г).

Реактив/система растворителей считается приемлемой, если (г) лежит в интервале от 97,5% до 102,5%.

Строят линию регрессии. На оси x откладывают совокупное количество добавленной воды, на оси y – сумму начального содержания воды, определенной в веществе (M), и совокупного количества воды, определенного после каждого добавления. Рассчитывают наклон (b), пересечение с осью y (a) и пересечение экстраполированной калибровочной кривой с осью x (d). Рассчитывают ошибку в процентах (e_1 и e_2), используя следующие формулы:

$$e_1 = 100 \frac{a - M}{M}$$

$$e_2 = 100 \frac{|d| - M}{M}$$

a = пересечение с осью y , в миллиграммах воды;

d = пересечение с осью x , в миллиграммах воды;

M = содержание воды в испытуемом веществе, в миллиграммах.

Реактив/система растворителей считается пригодной, если:

$-|e_1|$ и $|e_2|$ не более 2,5%;

b лежит в интервале 0,975 – 1,025.

VII) Общая зола (Ph. Eur. 11.0. 2.4.16. Общая зола): не более 0,25 %.

Определяют в 2,0 г испытуемого вещества.

Кварцевый или платиновый тигель нагревают до красного каления в течение 30 мин, охлаждают в эксикаторе и взвешивают. Если нет других указаний в частной статье, 1,00 г испытуемого вещества или измельченного в порошок лекарственного растительного сырья помещают в тигель и равномерно распределяют по дну тигля. Высушивают при температуре от 100 °C до 105 °C в течение 1 ч и затем сжигают до постоянной массы в муфельной печи при температуре (600±25) °C, охлаждая тигель в эксикаторе после каждого сжигания.

В продолжение всей процедуры в тигле не должно появляться пламя. Если после длительного сжигания зола всё ещё содержит тёмные частицы, содержимое тигля количественно переносят горячей водой на беззольный фильтр и сжигают остаток на фильтре вместе с фильтровальной бумагой. Фильтрат объединяют с золой, осторожно выпаривают до сухого остатка и сжигают до постоянной массы.

4.9. Желатин

I) Железо (Ph.Eur. 11.0. 2.2.23. Атомно-абсорбционная спектрометрия. Метод II): не более 30 ppm.

Испытуемый раствор: к 5,00 г испытуемого вещества, помещенного в коническую колбу, прибавляют 10 мл хлороводородной кислоты R. Колбу закрывают и помещают в водяную баню при температуре 75-80 °C на 2 часа (если необходимо, для надлежащего растворения желатин может быть выдержан для набухания после прибавления кислоты и перед нагреванием, время нагревания может быть увеличено, может быть использована более высокая температура). Охлаждают и доводят массу колбы до 100,0 г водой R.

Стандартные растворы: стандартные растворы готовят, используя железа эталонный раствор (8 ppm Fe) R, разведенный водой R.

Длина волны: 248,3 нм.

МЕТОД II - МЕТОД СТАНДАРТНЫХ ДОБАВОК

Испытуемый раствор готовят, как указано в частной статье. Равные объемы испытуемого раствора помещают не менее чем в три мерные колбы одинакового объема. Для получения ряда разведений в две колбы добавляют пропорционально увеличивающиеся объемы раствора определяемого элемента. Доводят содержимое каждой колбы растворителем до метки. При этом значение регистрируемых сигналов растворов со стандартными добавками (растворов сравнения) должно находиться в линейной области калибровочной кривой, если это возможно.

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.

ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДА

Соответствующее выполнение методик, приведенных в частных фармакопейных статьях, проверяется через приемлемые интервалы времени.

ЛИНЕЙНОСТЬ

Готовят и анализируют не менее чем 4 раствора сравнения в диапазоне калибровочной кривой и контрольный (холостой) раствор. Выполняют не менее 5 измерений каждого из растворов.

Методом наименьших квадратов из всех полученных данных рассчитывают линейное уравнение калибровочной кривой. Строится калибровочная кривая, оцениваются средние значения, полученные данные и доверительный интервал. Результаты, получаемые с помощью используемой методики, достоверны, если:

- коэффициент корреляции - не менее 0,99,

- остатки квадратов при каждой концентрации в случайном порядке распределены вокруг калибровочной кривой.

Вычисляют среднее и относительное стандартное отклонение для самой низкой и самой высокой концентраций, использовавшихся для построения калибровочной кривой. Если отношение вычисленных стандартных отклонений при самой низкой и самой высокой концентрациях менее чем 0,5 или больше чем 2,0, то может быть проведена более точная аппроксимация калибровочной кривой с использованием взвешенной линейной регрессии. Для обработки данных могут применяться линейные и квадратичные функции с взвешенными средними для выявления наиболее подходящей функции. Если средние значения при сравнении с калибровочной кривой, отклоняются от линейности, используется двумерная линейная регрессия.

ПРАВИЛЬНОСТЬ

Правильность методики проверки проверяют предпочтительно с использованием сертифицированного стандартного материала (CRM). Если это невозможно, выполняют испытание на открываемость.

Открываемость. Для методик количественного определения результат испытания должен составлять от 90 до 110 % от теоретического значения.

III Хром (Ph.Еug. 11.0. 2.2.23. Атомно-абсорбционная спектрометрия. Метод II): не более 10 ppm.

Испытуемый раствор: испытуемый раствор, описанный в испытании на железо (см. п I).

Стандартные растворы: стандартные растворы готовят, используя хрома эталонный раствор (100 ppm Cr) R, разведенный водой R.

Длина волны: 357,9 нм.

МЕТОД II - МЕТОД СТАНДАРТНЫХ ДОБАВОК (см. п I).

III Цинк (Ph.Еug. 11.0. 2.2.23. Атомно-абсорбционная спектрометрия. Метод II): не более 30 ppm.

Испытуемый раствор: испытуемый раствор, описанный в испытании на железо (см. п I).

Стандартные растворы: стандартные растворы готовят, используя цинка эталонный раствор (10 ppm Zn) R, разведенный водой R.

Длина волны: 213,9 нм.

МЕТОД II - МЕТОД СТАНДАРТНЫХ ДОБАВОК (см. п I).

5. Требования к исполнителю

5.1. Исполнитель должен иметь необходимый уровень компетентности для оказания Услуг, подтвержденный соответствующим документом, дающим право на проведения работ по оказанию Услуг.

5.2. Исполнитель должен быть аккредитован в национальной системе аккредитации (Росаккредитация).

5.3. Действующая область аккредитации исполнителя должна содержать показатели и методы их определения, указанные в п. 3 настоящего технического задания, таблица 1.

5.4. Исполнитель должен иметь материально-техническую базу, помещения, оборудование и персонал необходимые для выполнения работ в рамках оказания услуги.

5.5. Исполнитель гарантирует оказать все Услуги в полном объеме; качественно и в срок, с соблюдением санитарно-технических норм, правил техники безопасности и в соответствии с требованиями настоящего Технического задания (Приложение № 1), Спецификации (Приложение № 2),

Договора, а также в соответствии с нормативными правовыми актами (документами), предусмотренными законодательством Российской Федерации для данного вида Услуг.

5.6. После оказания Услуг Исполнитель предоставляет Заказчику отчет по верификации каждой методики анализа по показателям, Акт сдачи-приемки оказанных Услуг или Универсальный передаточный документ, счет на оплату, счет-фактуру (*в случае, если Исполнитель не является плательщиком НДС, счет-фактура не предоставляется*), и иные документы, предусмотренные законодательством Российской Федерации и оказанием услуг по Договору.

6. Порядок оформления результатов

Результаты верификации должны быть оформлены в виде отчета по верификации каждой методики анализа по показателям, перечисленным в таблице 1 п. 3 Технического задания. Первичные данные должны быть приложены к отчету в полном объеме и включать результаты измерений (числовые значения, хроматограммы, гистограммы, фотографии и прочее в зависимости от методики анализа) сведения об используемом оборудовании, программном обеспечении.