**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

**Аланил-глутамин, ФС**

**концентрат для приготовления**

**раствора для инфузий**

***Alanyl-glutaminum, concentratum***

***pro solutione infusionali* Вводится впервые**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на лекарственный препарат аланил-глутамина в форме концентрата для приготовления раствора для инфузий. Действующим веществом препарата является дипептид N(2)-L-аланил- L-глутамин.

В 1 л концентрата должно содержаться N(2)-L-аланил- L-глутамина от 90 до 110 % от заявленного количества. После разведения полученный раствор должен соответствовать требованиям, предъявляемым к инфузионным лекарственным средствам в соответствии с ОФС «Лекарственные формы для парентерального применения».

 ИСПЫТАНИЯ

**Описание.** Прозрачный, от бесцветного до бледно-желтого цвета раствор. Определение проводят органолептическим методом.

**Подлинность.** Для установления подлинности препарата идентифицируют действующее вещество N(2)-L-аланил-L-глутамин. Испытания проводят методом ВЭЖХ в соответствии с ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография».

 Время удерживания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора должно соответствовать времени удерживания основного пика на хроматограмме стандартного раствора N(2)-L-аланил-L-глутамина (раздел «Количественное определение»).

**Прозрачность.** Должен быть прозрачным или выдерживать сравнение с эталоном 1. Определение проводят в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей».

**Цветность.** Оптическая плотность препарата должна быть не более 0,2. Определение проводят методом спектрофотометрии (ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях»).

Оптическую плотность препарата измеряют при 400 нм в кювете с толщиной слоя 4 см. В качестве раствора сравнения используют натрия хлорида раствор 0,9 %.

**рН.** От 5,4 до 6,0. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

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

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

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

Посторонние примеси

Цикло-(L-аланил-L-глутаминил) - не более 6,0 %.

L-аланил-L-глутаминовая кислота - не более 1,0 %.

D-аланил-L-глутамин и L-аланил-D-глутамин - суммарно не более 0,25 %.

Пироглутаминовая кислота - не более 0,25 %.

L-пироглутамил-аланин - не более 0,65 %.

Цикло-L-аланил-L-глутамил - не более 0,05 %.

Единичная неидентифицированная примесь - не более 0,5 %.

Сумма всех неидентифицированных примесей - не более 1,0 %.

Испытания проводят одновременно с количественным определением N(2)-L-аланил-L-глутамина (раздел «Количественное определение»).

**Аммиак.** Не более 340 мг/л. Испытание проводят энзиматическим методом с последующей УФ-спектрофотометрией (ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях»), используя готовые наборы реагентов, имеющих достаточную чувствительность и специфичность.

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

**Осмолярность.** От 828,9 до 1013,1 мОсм/л. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Осмолярность».

**Бактериальные эндотоксины.** Не более 0,5 ЕЭ/мл. Определение проводят в соответствии с ОФС «Бактериальные эндотоксины».

**Аномальная токсичность**\***.** Препарат должен быть нетоксичным (ОФС «Аномальная токсичность»). Тест-доза 0,5 мл препарата на мышь; внутривенно; скорость введения 0,1 мл/с; срок наблюдения 48 ч.

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

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

**Количественное определение.** Содержание N(2)-L-аланил-L-глутамина должно быть от 90 до 110 % от заявленного количества. Испытание проводят методом ВЭЖХ в соответствии с ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография», одновременно проводят определение посторонних примесей (раздел «Посторонние примеси»).

Для приготовления растворов используют реактивы квалификации «Для жидкостной хроматографии».

*Подвижная фаза.* 1,36 г калия дигидрофосфата растворяют в 1000 мл воды, доводят pH до 2,1, используя фосфорную кислоту концентрированную, после чего добавляют 7,5 мл ацетонитрила и 0,108 г натрия октансульфоната.

*Стандартные растворы*

Срок годности стандартных растворов при (22 ± 3) °С не более 3 мес.

*Стандартные растворы для количественного определения L-аланил-L-глутамина.* Около 15,21 и 25 мг (точные навески) стандартного образца L-аланил-L-глутамина помещают в отдельные мерные колбы объемом 10 мл, растворяют в воде и доводят до метки. Около 1 мл каждого раствора вносят в отдельный флакон автодозатора.

*Стандартные растворы L-аланил-L-глутамина для определения продуктов разложения и посторонних примесей.* В качестве стандартов используют не менее трех растворов в интервале кон­центраций от 0,02 до 7,2 %, пересчитанных на содержание L-аланил-L-глутамина (табл.).

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Стандарты | Навеска,мг | Объем мер­ной колбы, мл | Растворитель | Разведение, мл | Содержание L-аланил-L-глутамина |
| мг/л | % |
| Стандарт - 1 | 10,0 | 250 | вода | 0,25 | 10,0 | 1,0 | 0,05 |
| Стандарт - 2 | 12,0 | 200 | вода | - | - | 60,0 | 3,01 |
| Стандарт - 3 | 12,0 | 100 | вода | - | - | 120,0 | 6,0 |

*Испытуемый раствор.* 0,2 мл препарата помещают в мерную колбу вместимостью 20 мл и доводят объем раствора водой до метки (раствор готовят в нескольких повторностях). Переносят 1 мл каждого полученного испытуемого раствора в отдельный флакон автодо­затора.

Срок годности испытуемого раствора при (22 ± 3) °С не более 3 мес.

*Раствор для определения пригодности хроматографической системы и идентификации примесей*

Для определения пригодности хроматографической системы и идентификации примесей готовят раствор аминокислот, для приготовления которого используют стандартные образцы субстанций, приведенные в таблице.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| № п/п | Название субстанции  | Сокращения |
| 1 | L-аланил-L-глутамин  | Ала-Глн | L-ала-L-глн |
| 2 | Цикло(L-аланил-L-глутаминил)  | Цикло(-Ала-Глн) | ц(L-ала-L-глн) |
| 3 | L-пироглутаминовая кислота  | L-пироглут. к-та | -L-пироглу |
| 4 | L-пироглутамил-L-аланин  | Пир-Ала-ОН | L-пироглу-L-ала |
| 5 | Цикло(L-аланил-L-глутамил)  | Цикло(Ала-Глу) | ц(L-ала-L-глн) |
| 6 | D-аланил-L-глутамин  | H-D-Ала-Глн-ОН | D-aлa-L-глн |
| 7 | L-аланил-L-глутаминовая кислота  | Н-Ала-Глу-ОН | L-ала-L-глу |
| 8 | L-аланил-L-аланил-L-глутамин  | Н-Ала-Ала-Глн-ОН | L-ала-L-ала-L-глн |
| 9 | L-глутамил-L-аланин  | Н-Глу-Ала-ОН | L-глу-L-ала |
| 10 | L-гамма-глутамил-L-аланин  | Н-γ-Глу-Ала- ОН | L-γ-глу-L-ала |
| 11 | L-аланил-L-глутамил-L-аланил-L-глутамин  | Ала-Глу-Ала-Глн | ала-глу-ала-глн |
| 12 | L-аланил-гамма-L-глутамил-L-аланил-L-глутамин  | Ала-(γ-Глу)-Ала-Глн | ала-(γ-глу)-ала-глн |

Точные навески исходных веществ, указанных в таблице, помещают в отдельные мерные колбы, растворяют и доводят до метки водой. После чего определенное количество каждого раствора помещают в мерную колбу и доводят до метки водой, как указано в таблице.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Наименование веще­ства | Навеска, мг | Объем мерной колбы, мл | Кол-во отобранного раствора (обьем мерной колбы 20 мл), мл |
| Ала-Глн | 24 | 10 | 0,5 |
| Цикло(-Ала-Глн) | 10 | 10 | 1,2 |
| L-пироглут. к-та | 10 | 50 | 0,4 |
| Пир-Ала-ОН | 10 | 50 | 1,0 |
| Цикло(Ала-Глу) | 10 | 250 | 0,3 |
| H-D-Ала-Глн-ОН | 10 | 50 | 0,4 |
| Н-Ала-Глу-ОН | 10 | 50 | 1,0 |
| Н-Ала-Ала-Глн-ОН | 10 | 50 | 0,6 |
| Н-Глу-Ала-ОН | 10 | 50 | 0,6 |
| Н-γ-Глу-Ала- ОН | 10 | 50 | 0,6 |
| Ала-Глу-Ала-Глн | 10 | 50 | 0,6 |
| Ала-(γ-Глу)-Ала-Глн | 10 | 50 | 0,6 |

*Примечание.* L-аланил-L-аланил-L-глутамин (L-ала-L-ала-L-глн или Н-Ала-Ала-Глн-ОН) является по­бочным продуктом производства L-аланил-L-глутамина и его контролируют при анализе лекарственной субстанции.

L-аланил-L-аланил-L-глутамин не является продуктом разложения L-аланил-L-глутамина, поэтому стандартный образец L-ала-L-ала-L-глн необходим только для приготовления раствора аминокислот для определения пригодности хроматографической системы и идентификации примесей.

*Порядок инжекиий:* раствор сравнения, раствор для подтверждения пригодности хроматографической системы, стандартные растворы для определения продуктов разложения и посторонних примесей, стандартные растворы для определения L-аланил-L-глутамина, испытуемые растворы.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка Температура колонки Температура образцовСкорость потокаДетекторОбъем пробыВремя хроматографирования | 250 х 4,6 мм; силикагель октадецилсилильный, деактивированный по отношению к основаниям, для хроматографии (С18), 3 мкм(16 ± 1) °С(5 ± 3) °С1,5 мл/мин УФ-детектор20 мкл 50 мин |

Элюирование проводят в режиме программирования состава подвижной фазы (при необходимости градиент может быть скорректирован с целью улучшения разделения пиков). Необходимо учитывать, что градиент является ориентировочным.

1. Длина волны определения
	1. L-аланил-L-глутамин. Количественное определение (215 нм/

4 нм ширина полосы).

* 1. L-аланил-L-глутамин. Продукты деградации и посторонние примеси (200 нм/4 нм ширина полосы).
1. Длина волны сравнения
	1. L-аланил-L-глутамин. Количественное определение (550 нм/ 100 нм ширина полосы).
	2. L-аланил-L-глутамин. Продукты деградации и посторонние примеси (550 нм/100 нм ширина полосы).

*Система пригодности*

Корреляция стандартных растворов. Графики линейной зависимости, построенные по данным хроматограмм стандартных рас­творов, должны иметь коэффициент корреляции 0,998.

Если один из коэффициентов корреляции меньше 0,998, то соответствующая оценка как для количественного определения L-аланил-L-глутамина, так и для определения продуктов разложения и посторонних примесей не проводится.

Разрешение между пиками, полученными на хроматограмме раствора для определения пригодности хроматографической системы, должно быть

≥ 1,5.

Разрешение между пиками (*R)* рассчитывают по следующей формуле:

$R=\frac{\left(\frac{2,35}{2}\right) ∙(Tr(B) - Tr\left(A\right))}{W50\left(B\right)+ W50(А)},$ где

*TR(B)* **-** время удерживания пика В, мин;

*Tr(а)***-** время удерживания пика А, мин;

*W50(B)* **-** ширина на 50 % высоты пика В;

*W50(А)*-ширина на 50 % высоты пика А.

Коэффициент асимметрии для L-аланил-L-глутамина – 0,22.

*Проверка пригодности хроматографической системы*

Для определения продуктов разложения и посторонних примесей в следующей таблице приведены значения относительных факторов отклика (RRF) и относительных времен удерживания пиков (RRT).

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Наименованиесубстанции | Относительный факторотклика (RRF) | Относительные времена удерживания пиков (RRT) |
| L-аланил-L-глутамин | - | RT: 13,50 мин |
| Цикло(Ала-Глн) | 0,4888 | 0,32 |
| L-пироглутаминовая к-та | 0,9566 | 0,35 |
| Пир-Ала-ОН | 0,5990 | 0,52 |
| Цикло(Ала-Глу) | 0,5045 | 0,57 |
| Н- D-Ала-Глн-ОН | 1,0027 | 1,34 |
| Н-Ала- Глу-ОН | 1,3722 | 1,76 |
| L-глутамин \* (L-глн) | 2,7456 | 5,100 |
| L-аланин \* (L-ала) | 32,3220 | 7,203 |
| L-глутаминовая к-та\* (L-глу) | 30,3766 | 7,423 |
| Н-Ала-Ала-Глн-ОН | 0,7767 | 1,6 |
| Другие компоненты | 1,0 |  |

\*Указанные посторонние примеси определяют только в субстанции и не учитывают при расчете суммы содержания посторонних примесей.

Используя времена удерживания пиков на хроматограммах стандартных растворов, иден­тифицируют пики на хроматограммах испытуемых растворов.

*Учёт результатов*

Расчет количественного определения L-аланил-L-глутамина. Методом внешней калибровки (измерение при 215 нм) рассчитывают линию регрессии от площади пиков, полученных от соответствующих стандартных растворов.

Количество L-аланил-L-глутамина(*X*, г/л) рассчитывают как среднее значение из двух отдельных определений двух испытуемых растворов по следующей формуле:

$X=\frac{\left(Y-b\right) ∙ Vк }{m∙ Vп},$ где

*Y* - площадь пика L-аланил-L-глутамина, полученного на хроматограмме испытуемого раствора;

*b* - отсекаемый отрезок линии регрессии;

*m* - тангенс угла наклона;

*Vк* - объем колбы, мл;

*Vп* - объем пипетки, мл.

Относительное стандартное отклонение отдельных результатов должно быть не более 2,0 %.

Идентифицированные посторонние примеси. Для расчета содержания идентифицированных посторонних примесей в испытуемом рас­творе (в % к заявленному количеству L-аланил-L-глутамина) используют стандартный раствор с наиболее близкой площадью пика.

Расчет производят по следующей формуле (измерение проводят при 200 нм):

$\% соединения=\frac{Sприм. ∙ Vк ∙ C1 ∙ RRF ∙100 }{S(L-ала-L-глн) ∙ Vп ∙ L },$ где

*S прим.* **-** площадь пика идентифицированной примеси;

*S(L-ала-L-глн)* - площадь пика L-ала-L-глн в стандартном растворе для определения посторонних примесей;

*Vк* - объем колбы, мл;

*Vп* - объем пипетки, мл;

*С1* - концентрация L-ала-L-глн в стандартном растворе для

определения посторонних примесей;

*RRF* - относительный фактор отклика (таблица в разделе «Количественное определение. *Проверка пригодности хроматографической системы»*);

*L* - заявленное количество основного вещества в препарате (200 мг/мл).

Содержание идентифицированных посторонних примесей (в % к заявленному количеству L-аланил-L-глутамина) в испытуемом растворе после разведения рассчитывают как среднее значение нескольких отдельных определений.

Относительное стандартное отклонение отдельных результатов не должно превышать 10,0 %.

Сумму идентифицированных примесей рассчитывают, используя результаты, полученные при определении единичных идентифицированных примесей.

Неидентифицированные примеси. Для расчета содержания неидентифицированных примесей в испытуемом рас­творе (в % относительно L-аланил-L-глутамина) используют следующую формулу (измере­ние при 200 нм):

$\% соединения=\frac{Sнприм. ∙ Vк ∙ C1 ∙ RRF ∙100 }{S(L-ала-L-глн) ∙ Vп ∙ L },$ где

*S нприм.* - площадь пика неидентифицированной примеси;

*S(L-ала-L-глн)* - площадь пика L-ала-L-глн в стандартном растворе для определения посторонних примесей;

*Vк* - объем колбы, мл;

*Vп* - объем пипетки, мл;

*С1* - концентрация L-ала-L-глн в стандартном растворе для

определения посторонних примесей;

*RRF* - относительный фактор отклика (таблица в разделе «Количественное определение. *Проверка пригодности хроматографической системы»*);

*L* - заявленное количество основного вещества в препарате (200 мг/мл).

Содержание неидентифицированных посторонних примесей (в % к заявленному количеству L-аланил-L-глутамина) в испытуемом растворе после разведения рассчитывают как среднее значение нескольких отдельных определений.

Относительное стандартное отклонение отдельных результатов не должно превышать 10,0 %.

Сумму неидентифицированных примесей рассчитывают, используя результаты, полученные при определении единичных неидентифицированных примесей.

**Хранение.** При температуре не выше 25 °С в соответствии с и ОФС «Хранение лекарственных средств».