**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |
| --- |
|  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Циластатин натрия** |  | **ФС** |
| **Циластатин** |  |  |
| **Cilastatinum natricum** |  | **Вводится впервые** |

|  |
| --- |
|  |
| (*Z*)-7-[((2*R*)-2-амино-2-карбоксиэтил)сульфанил]-2-{[((1*S*)-2,2-диметилциклопропил)карбонил]амино}гепт-2-еноат натрия  |
|  |
| C16H25N2NaO5S | М.м. 380,4 |

 Cодержит не менее 98,0 % и не более 101,5 % циластатина натрия C16H25N2NaO5Sв пересчёте на безводное и свободное от остаточных органических растворителей вещество.

**Описание**. Белый или светло-жёлтый аморфный порошок. \*Гигроскопичен.

**Растворимость**. Очень легко растворим в воде и метаноле, мало растворим в этаноле, очень мало растворим в диметилсульфоксиде, практически нерастворим в ацетоне и метиленхлориде.

**Подлинность**

*1. ИК-спектрометрия* (ОФС «Спектрометрия в инфракрасной области»)*.* Инфракрасный спектр субстанции, снятый в диске с калия бромидом, в области от 4000 до 400 см–1 по положению полос поглощения должен соответствовать спектру стандартного образца циластатина натрия.

*2. Качественная реакция.* Субстанция должна давать характерную реакцию А на натрий (ОФС «Общие реакции на подлинность»).

**Удельное вращение.** От +41,5 до +44,5 в пересчете на безводное вещество (ОФС «Поляриметрия»).

*Испытуемый раствор.* В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 0,25 г субстанции, растворяют в смеси хлористоводородная кислота концентрированная—метанол 1:120 и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

**Прозрачность раствора.** Раствор субстанции 1 % в воде, свободной от диоксида углерода, должен быть прозрачным (ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей»).

**Цветность раствора.** Раствор, полученный в испытании «Прозрачность раствора», должен выдерживать сравнение с эталоном Y6 (ОФС «Степень окраски жидкостей», метод 2).

**pH.** От 6,5 до 7,5 (раствор, полученный в испытании «Прозрачность раствора», ОФС «Ионометрия», метод 3).

**Родственные примеси**

***Примесь D, ацетон и метанол.*** Определение проводят методом ГХ (ОФС «Газовая хроматография»).

Раствор внутреннего стандарта. В мерную колбу вместимостью 1 л помешают 0,5 мл пропанола, растворяют в воде и доводят объём раствора водой до метки.

Испытуемый раствор. Около 0,2 г (точная навеска) субстанции помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, растворяют в воде, прибавляют 2,0 мл раствора внутреннего стандарта и доводят объём раствора водой до метки.

*Стандартный раствор.* В мерную колбу вместимостью 1 л помещают 2,0 мл ацетона, 0,5 мл метанола, 0,5 мл мезитилоксида (примесь D) и доводят объём раствора водой до метки. В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 2,0 мл полученного раствора, 2,0 мл раствора внутреннего стандарта и доводят объём раствора водой до метки.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | кварцевая капиллярная, 30 м × 0,53 мм, покрытая слоем макрогола 20000, 1 мкм; |
| Детектор | пламенно-ионизационный; |
| Газ-носитель | гелий; |
| Скорость потока | 9 мл/мин; |
| Объём пробы | 1 мкл; |
| Температура |  | Время, мин | Температура, °C |
|  | Колонка | 0 – 2,52,5 – 55 – 5,5 | 5050 → 7070 |
|  | Инжектор | – | 160 |
|  | Детектор | – | 220 |

Хроматографируют стандартный раствор и испытуемый раствор.

Содержание каждой из примесей в субстанции в процентах (*Х*) вычисляют по формуле:

$$X=\frac{B\_{1}∙C\_{0}∙10}{B\_{0}∙a\_{1}∙10}=\frac{B\_{1}∙C\_{0}}{B\_{0}∙a\_{1}}$$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *B1* | **–** | отношение площади пика примеси D, ацетона или метанола к площади пика внутреннего стандарта на хроматограмме испытуемого раствора; |
|  | *B*0 | **–** | отношение площади пика примеси D, ацетона или метанола к площади пика внутреннего стандарта на хроматограмме стандартного раствора; |
|  | *a1* | **–** | навеска испытуемой субстанции, мг; |
|  | *С0* | **–** | концентрация примеси D, ацетона, или метанола в стандартном растворе, мкг/мл. |

*Допустимое содержание примесей.*

– ацетон - не более 1,0 %;

– метанол - не более 0,5 %;

– примесь D - не более 0,4 %.

***Другие примеси****.* Определение проводят методом ВЭЖХ (ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография»).

Все растворы используют сразу после приготовления.

*Подвижная фаза А (ПФА).* Растворяют 1,36 г калия дигидрофосфата в воде, доводят значение рН до 3,25±0,05 фосфорной кислотой разведённой 10 %, переносят в мерную колбу вместимостью 1 л и доводят объём раствора водой до метки.

*Подвижная фаза Б (ПФБ).* Ацетонитрил—ПФА 500:500.

*Испытуемый раствор.* В мерную колбу вместимостью 20 мл помещают 32 мг субстанции, растворяют в воде и доводят объём раствора водой до метки.

*Раствор сравнения.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 1,0 мл испытуемого раствора и доводят объём раствора водой до метки. В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 1,0 полученного раствора и доводят объём раствора водой до метки.

*Раствор для проверки разделительной способности хроматографической системы (А).* Растворяют 3 мг стандартного образца циластатина для проверки пригодности системы 1, содержащий примеси А, В, Е, F, G (эпимер 2) и Н, в 2 мл воды.

*Раствор для проверки разделительной способности хроматографической системы (Б).* Растворяют 3 мг стандартного образца циластатина для проверки пригодности системы 2, содержащий примеси С и G (эпимер 1), в 2 мл воды.

*Раствор для идентификации пика примеси D.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 32 мг мезитилоксида (примесь D), растворяют в воде и доводят объём раствора водой до метки. В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 1,0 мл полученного раствора и доводят объём раствора водой до метки.

Примечание

Примесь А: (*Z*)-7-[(*RS*)-((2*R*)-2-амино-2-карбоксиэтил)сульфинил]-2-{[((1*S*)-2,2-диметилциклопропил)карбонил]амино}гепт-2-еновая кислота.

Примесь В: (*Z*)-7-{[(2*R*)-2-((1*RS*)-1-метил-3-оксибутил)амино-2-карбоксиэтил]сульфанил}-2-{[((1*S*)-2,2-диметилциклопропил)карбонил]амино}гепт-2-еновая кислота.

Примесь С: (*Z*)-7-{[(2*R*)-2-((1,1-диметил-3-оксибутил)амино-2-карбоксиэтил]сульфанил}-2-{[((1*S*)-2,2-диметилциклопропил)карбонил]амино}гепт-2-еновая кислота.

Примесь D (мезитилоксид): 4-метилпент-3-ен-2-он, CAS 141-79-7.

Примесь Е: 7-[((2*R*)-2-амино-2-карбоксиэтил)сульфанил]-2-оксогептановая кислота, CAS 1174657-07-8.

Примесь F: (*Z*)-7-[((2*R*)-2-амино-2-карбоксиэтил)сульфанил]-2-[(2,3-диметилбут-3-еноил)амино]гепт-2-еновая кислота.

Примесь G: (*E*)-(2*RS*)-7-[((2*R*)-2-амино-2-карбоксиэтил)сульфанил]-2-{[((1*S*)-2,2-диметилциклопропил)карбонил]амино}гепт-3-еновая кислота.

Примесь Н: (*Z*)-7-[(2-аминоэтил)сульфанил]-2-{[((1*S*)-2,2-диметилциклопропил)карбонил]амино} гепт-2-еновая кислота.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 250 × 4,6 мм, силикагель октадецилсилильный совместимый с водной подвижной фазой эндкепированный для хроматографии, 5 мкм; |
| Температура колонки | 50 °С; |
| Скорость потока | 2,0 мл/мин;  |
| Детектор | спектрофотометрический, 210 нм; |
| Объём пробы | 20 мкл. |

*Режим хроматографирования*

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Время, мин | ПФА, % | ПФБ, % |
| 0 – 3 | 100 | 0 |
| 3 – 28 | 100 → 90 | 0 → 10 |
| 28 – 38 | 90 | 10 |
| 38 – 63 | 90 → 50 | 10 → 50 |
| 63 – 78 | 50 → 30 | 50 → 70 |
| 78 – 88 | 30 | 70 |

Хроматографируют раствор для проверки разделительной способности хроматографической системы (А), раствор для проверки разделительной способности хроматографической системы (Б), раствор для идентификации пика примеси D, раствор сравнения и испытуемый раствор.

*Идентификация примесей.* Для идентификации пиков примесей А, В, Е, F и G используют хроматограмму раствора для проверки разделительной способности хроматографической системы (А) и хроматограмму, прилагаемую к стандартному образцу циластатина для проверки пригодности системы 1. Для идентификации пиков примесей С и G используют хроматограмму раствора для проверки разделительной способности хроматографической системы (Б) и хроматограмму, прилагаемую к стандартному образцу циластатина для проверки пригодности системы 2.

*Относительное время удерживания соединений*. Циластатин – 1 (около 50 мин); примесь Е – около 0,20; примесь A (эпимер 1) – около 0,60; примесь А (эпимер 2) – около 0,62; примесь D – около 0,90; примесь F – около 0,98; примесь G (эпимер 1) – около 1,02; примесь G (эпимер 2) – около 1,05; примесь Н – около 1,06; примесь В – около 1,17; примесь С – около 1,23.

*Пригодность хроматографической системы*

На хроматограмме раствора для проверки разделительной способности хроматографической системы (А) *отношение максимум/минимум (p/v)* между пиками примеси F и циластатина должно быть не менее 10,0.

На хроматограмме раствора для проверки разделительной способности хроматографической системы (Б) *отношение максимум/минимум (p/v)* между пиками циластатина и примеси G (эпимер 1)должно быть не менее 2,5.

*Поправочные коэффициенты.* Для расчёта содержания примесей площади пиков следующих примесей умножаются на соответствующие поправочные коэффициенты: примесь С – 1,3; примесь Е – 3,3; примесь G (эпимер 1) и примесь G (эпимер 2) – 1,6.

Содержание любой примеси в субстанции в процентах (*Х*) вычисляют по формуле:

$$X=\frac{S\_{1}∙20∙1∙1}{S\_{0}∙20∙100∙10}∙100=\frac{S\_{1}}{S\_{0}∙10}$$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *S1* | − | площадь пика любой примеси на хроматограмме испытуемого раствора; |
|  | *S0* | − | площадь пика циластатина на хроматограмме раствора сравнения. |

*Допустимое содержание примесей:*

− примесь А (сумма эпимеров) - не более 0,5 %;

− примесь С - не более 0,4 %;

− примесь Е - не более 0,3 %;

− каждой из примеси B, F, H, G (эпимер 1), G (эпимер 2) - не более 0,1 %;

− единичная неидентифицированная примесь - не более 0,05 %;

− сумма примесей - не более 1,0 %.

Не учитывают пик примеси D и пики менее 0,03 %.

**Вода.** Не более 2,0 % (ОФС «Определение воды», метод 1). Для определения используют около 0,5 г (точная навеска) субстанции.

**Тяжёлые металлы.** Не более 0,002 % (ОФС «Тяжёлые металлы», метод 2).

*Испытуемый раствор.* В кварцевый тигель помещают 1,0 г субстанции, прибавляют 4 мл магния сульфата раствора 25 % в серной кислоте разведённой 9,8 %, перемешивают тонкой стеклянной палочкой, нагревают до температуры 800 °C, пока остаток в тигле не приобретёт белый или серый цвет. Полученный остаток охлаждают, смачивают несколькими каплями серной кислотой разведённой 9,8 %, выпаривают, повторно прокаливают и охлаждают. Полученный остаток количественно переносят двумя порциями по 5 мл хлористоводородной кислоты разведённой 7,3 % в мерную колбу вместимостью 20 мл, прибавляют 0,1 мл фенолфталеина раствора 0,1 %, затем осторожно прибавляют аммиака раствор концентрированный 25 % до перехода окраски в розовую. К полученному раствору прибавляют уксусную кислоту ледяную до обесцвечивания раствора и дополнительно 0,5 мл уксусной кислоты ледяной. Доводят объём раствора водой до метки. При необходимости фильтруют.

*Стандартный раствор*. Готовят, как описано для испытуемого раствора, используя вместо испытуемой субстанции 2,0 мл стандартного раствора 10 мкг/мл свинец-иона (ОФС «Тяжёлые металлы»). К 10,0 мл полученного раствора прибавляют 2,0 мл испытуемого раствора.

*Раствор сравнения.* Готовят, как описано для испытуемого раствора, прибавляя к испытуемой субстанции 2,0 мл стандартного раствора 10 мкг/мл свинец-иона. К 10,0 мл полученного раствора прибавляют 2,0 мл испытуемого раствора.

*Контрольный раствор.* К 10,0 мл воды прибавляют 2,0 мл испытуемого раствора.

К 12,0 мл каждого раствора прибавляют 2,0 мл буферного раствора рН 3,5, перемешивают и прибавляют 1,2 мл тиоацетамидного реактива. Немедленно перемешивают. Через две минуты сравнивают окраски полученных растворов.

*Пригодность системы:*

- стандартный раствор по сравнению с контрольным раствором должен быть окрашен в светло-коричневый цвет;

- окраска раствора сравнения должна быть не менее интенсивна, чем окраска стандартного раствора.

*Допустимое содержание тяжёлых металлов*. Окраска испытуемого раствора не должна превышать по интенсивности окраску стандартного раствора.

При затруднении в оценке растворы фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм. Фильтрование проводят медленно и единообразно при умеренном и постоянном нажатии на поршень. Сравнивают пятна на фильтрах, полученные от фильтрования различных растворов. Коричневая окраска пятна на фильтре, полученного после фильтрования испытуемого раствора, не должна превосходить по интенсивности окраску пятна на фильтре, полученного после фильтрования стандартного раствора.

**Остаточные органические растворители.** В соответствии с ОФС «Остаточные органические растворители».

**\*\*Бактериальные эндотоксины.** Не более 0,17 ЕЭ на 1 мг циластатина натрия (ОФС «Бактериальные эндотоксины»).

**Микробиологическая чистота.** В соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота».

**Количественное определение**. Определение проводят методом титриметрии.

Около 0,1 г (точная навеска) субстанции растворяют в 30 мл метанола, прибавляют 5 мл воды, доводят значение рН до 3,0±0,1 хлористоводородной кислоты раствором 0,1 М и титруют 0,1 М раствором натрия гидроксида. Конечную точку титрования определяют потенциометрически (ОФС «Потенциометрическое титрование»). Учитывают объем титранта, израсходованный между первой и третьей точками перегиба на кривой титрования.

1 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида соответствует 19,02 мг циластатина натрия C16H25N2NaO5S.

**Хранение**. В сухом месте при температуре от 2 до 8 °С.

\*Приводится для информации.

\*\*Испытание проводят для субстанции, предназначенной для производства лекарственных препаратов для парентерального применения.