**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |
| --- |
|  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Аланил-аспартил-глутамил-лейцин+Аспартил-глутамил-аргинин +Аспартил-глутамил-глицин +Аспартил-глутамил-пролин +Лизил-аспартил-глутаминовая кислота** |  | **ФС** |
| **Аланил-аспартил-глутамил-лейцин+Аспартил-глутамил-аргинин +Аспартил-глутамил-глицин +Аспартил-глутамил-пролин +Лизил-аспартил-глутаминовая кислота** |  |  |
| **Alanyl-aspartyl-glutamyl-leucinum + Aspartyl- glutamyl-argininum + Aspartyl- glutamyl- glycinum + Aspartyl- glutamyl-prolinum + Lysyl-aspartyl-acidum glutaminicum** |  | **Вводится впервые** |

|  |
| --- |
|  |

Настоящая фармакопейная статья распространяется на субстанцию, состоящую из смеси олигопептидов:

- L-аланил-L-α-аспартил-L-α-глутамиллейцина ацетат C18H30N4O9 ∙ С2Н4О2 (М.м. 506,5);

- L-α-аспартил-L-α-глутамиларгинина ацетат C15H26N6O8 ∙ С2Н4О2 (М.м. 478,5);

- L-α-аспартил- L-α-глутамилглицина ацетат C11H17N3O8 ∙ С2Н4О2 (М.м. 379,32);

- L-α-аспартил- L-α-глутамилпролина ацетат C14H21N3O8 ∙ С2Н4О2 (М.м. 419,4);

- L-лизил-L-α-аспартилглутаминовой кислоты ацетат C15H26N4O8 ∙ С2Н4О2 (М.м. 450,4).

Содержание в субстанции компонентов в пересчете на безводное, сво­бодное от органических растворителей и уксусной кислоты, вещество должно составлять:

 - аспартил-глутамил-глицин – от 158,33 до 175,00 мг/г (C11H17N3O8);

- лизил-аспартил-глутаминовая кислота – от 316,65 до 349,99 мг/г (C15H26N4O8);

- аспартил-глутамил-аргинин – от 158,33 до 175,00 мг/г (C15H26N6O8);

- аспартил-глутамил-пролин – от 158,33 до 175,00 мг/г (C14H21N3O8);

- аланил-аспартил-глутамил-лейцин – от 158,33 до 175,00 мг/г (C18H30N4O9).

**Описание.** Белый, почти белый или белый с желтоватым оттенком аморфный по­рошок. Допускается легкий характерный запах.

**Растворимость.** Легко растворим в воде, практически не растворим в спирте 96 % и этилацетате.

**Подлинность.**

1. *ВЭЖХ.* Время удерживания одного из пяти основных пиков на

хроматограмме испытуемого раствора должно соответствовать времени удерживания пика аланил-аспартил-глутамил-лейцина (или аспартил-глутамил-аргинина, или аспартил-глутамил-глицина, или аспартил-глутамил-пролина, или лизил-аспартил-глутаминовой кислоты) на хроматограмме стандартного раствора образца (раздел «Количественное определение»).

1. Качественные реакции

Реакция с нингидрином. 0,01 г субстанции растворяют в 1 мл воды, добавляют 1 мл нингидрина спиртового раствора и нагревают на водяной бане при (95 ± 3) °С в течение 30 мин. Должно наблюдаться фиолето­вое окрашивание.

Биуретовая реакция. 0,01 г субстанции растворяют в 1 мл воды, добавляют 0,5 мл натрия гидроксида раствора 30 % и 1 - 2 капли меди (II) сульфата раствора 1 %. Должно наблюдаться фиолето­вое окрашивание.

**Прозрачность раствора.** Раствор 0,02 г субстанции в 20 мл воды, сво­бодной от углерода диоксида, должен быть прозрачным или выдерживать сравнение с эталоном 1 (ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей»).

**Цветность раствора.** Раствор субстанции, приготовленный для проведения испы­таний по показателю «Прозрачность раствора», должен быть бесцветным или выдерживать сравнение с эталоном В9 (ОФС «Степень окраски жидкостей»).

**рН.** От 3,0 до 5,0 (0,1 % раствор субстанции в воде, свободной от углерода диок­сида, приготовленный для проведения испытаний по показателю «Прозрачность раствора»). Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Родственные примеси. Определение проводят методом ВЭЖХ в соответствии с требованиями ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография» одновременно с количественным определением (раздел «Количественное определение).

*Подвижная фаза А (ПФА).* 21,1 гнатрия перхлората растворяют в 950 мл воды, доводят pH раствора фосфорной кислотой концентрированной до (2,0 ± 0,02). Раствор переносят в мерную колбу вместимостью 1000 мл, доводят объем раствора во­дой до метки, перемешивают, фильтруют и дегазируют. Раствор используют свежеприготовленным.

*Подвижная фаза Б (ПФБ).* В мерную колбу вместимостью 500 мл помещают 150 мл ПФА, доводят объем раствора ацетонитрилом для хроматографии до метки, перемешивают, фильтруют и дегазируют. Раствор используют свежеприготовленным.

*Испытуемый раствор.* Около 50 мг (точная навеска) субстанции помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, растворяют в 5 мл ПФА, после чего доводят объем раствора тем же растворителем до метки. Раствор используют свежеприготовленным.

*Раствор стандартного образца.* Около 8,5 мг (точная навеска) стандартного образца аланил-аспартил-глутамил-лейцина, аспартил-глутамил-аргинина, аспартил-глутамил-глицина, аспартил-глутамил-пролина и 16,5 мг стандартного образца лизил-аспартил-глутаминовой кислоты помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, растворяют в 5 мл ПФА, при необходимости обрабатывают ультразвуком, и доводят объем раствора тем же растворителем до метки.

1,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл и доводят объем раствора ПФА до метки. Раствор используют свежеприготовленным.

*Раствор сравнения.* Около 6,25 мг (точная навеска) стандартного образца аспартил-глутамил-аргинина помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 10 мл ПФА, при необходимости обрабатывают ультразвуком, и доводят объем раствора тем же растворителем до метки. 1,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл и доводят объем раствора ПФА до метки. Раствор используют свежеприготовленным.

*Раствор для проверки чувствительности хроматографической системы.* 1,5 мл раствора стандартного образца помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят объем раствора ПФА до метки. Раствор используют свежеприготовленным.

Холостой раствор. Подвижная фаза А (ПФА).

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка Температура колонки Скорость потокаДетекторОбъем пробы | 250 х 4,6 мм; силикагель октадецилсилильный для хроматографии (С18), 5 мкм(35 ± 2) °С1,0 мл/мин УФ-детектор, 200 нм20 мкл  |

Элюирование осуществляют в режиме градиентного элюирования (линейный градиент) в соответствии со следующей таблицей.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| № | Время, мин | ПФА, % | ПФБ, % |
| 1 | 0,00 | 100 | 0 |
| 2 | 8,00 | 100 | 0 |
| 3 | 40,00 | 40 | 0 |
| 4 | 40,10 | 100 | 0 |
| 5 | 45,00 | 100 | 0 |

В указанных условиях ожидаемые времена удерживания составляют:

- аспартил-глутамил-глицин - около 5,7 мин;

- лизил-аспартил-глутаминовая кислота - около 6,7 мин;

- аспартил-глутамил-аргинин - около 11,7 мин;

- аспартил-глутамил-пролин - около 17,9 мин;

- аланил-аспартил-глутамил-лейцин - около 25,9 мин.

*Проверка пригодности хроматографической системы*

Регистрируют хроматограммы холостого раствора*,* раствора для проверки чувствительности хроматографической системы и не менее трех последовательных хроматограмм раствора сравнения.

Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются приведенные ниже условия.

*Для раствора сравнения:*

* эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику аспартил-глутамил-аргинина, не менее 3000 теоретических тарелок;
* фактор асимметрии пика аспартил-глутамил-аргинина не более 2,0;
* относительное стандартное отклонение площадей пика аспартил-глутамил-аргинина не более 5,0 %.

*Для раствора для проверки чувствительности хроматографической системы:*

- отношение сигнал – шум, рассчитанное по шуму, измеренному на расстоянии, равном пяти ширинам пика определяемого компонента на его полувысоте для пика аспартил-глутамил-аргинина,не менее 10;

- разрешение между пиками аспартил-глутамил-глицина и лизил-аспартил-глутаминовой кислоты не менее 3,0.

*Учёт результатов*

После проверки пригодности хроматографической системы регистрируют не менее трех хроматограмм испытуемого раствора.

Содержание единичной неидентифицированной примеси (Xi,%) и сумму примесей (X,%) в субстан­ции рассчитывают по формуле:

$$Xi (X)=\frac{S∙a\_{0}∙P ∙100}{S\_{0}∙a∙25∙(100-W)}, где$$

S - средняя площадь пика единичной примеси (пиков всех примесей) на хроматограмме испытуемого раствора;

So - средняя площадь пика аспартил-глутамил-аргининана хроматограмме раствора сравнения;

a - навеска субстанции, г;

ao - навеска стандартного образца аспартил-глутамил-аргининав растворе сравнения, г;

Р - содержание основного вещества в стандартном образце аспартил-глутамил-аргинина, %.

*25* - коэффициент, учитывающий разведение;

W - содержание воды, остаточных органических растворителей и уксусной кислоты в испытуемом образце, %.

Не учитываются пики со временем удерживания менее 3 мин; пики, присутствующие на хроматограмме холостого раствора, пики неидентифи- цированных примесей, площадь которых менее площади пика аспартил-глутамил-аргинина на хрома­тограмме раствора для проверки чувствительности хроматографической системы (менее 0,05 %).

Содержание в субстанции единичной неидентифицированной примеси должно быть не более 0,5 %, суммы примесей - не более 5,0 %.

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

Тяжелые металлы. Не более 0,001 %. Сульфатная зола из 1,0 г субстанции должна выдер­живать испытание на тяжелые металлы (ОФС «Тяжёлые металлы», метод 1).

Вода. Не более 10,0 %. Для определения используют около 0,3 г (точная навеска) субстанции. Испытание проводят методом К. Фишера (ОФС «Определение воды», метод 1).

**Остаточные органические растворители.** Определение проводят в соответствии с ОФС «Остаточные органические растворители**»**.

**Уксусная кислота.** Определение проводят методом газовой хроматографии (ОФС «Газовая хроматография»).

Раствор внутреннего стандарта. В мерную колбу вместимостью 100 мл, содержащую 60 мл воды, добавляют 0,1 мл диоксана, 10 мл фосфорной кислоты концентрированной, перемешивают, охлаждают до комнатной температуры и доводят объем раствора во­дой до метки. Раствор используют свежеприготовленным.

Испытуемый раствор. Около 0,1 г (точная навеска) субстанции поме­щают в мерную колбу вместимостью 10 мл, растворяют в 7 мл раствора внутреннего стандарта и доводят объем раствора тем же растворителем до метки. Раствор используют свежеприготовленным.

Стандартный раствор. Около 0,25 г (точная навеска) уксусной кисло-

ты помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, содержащую 10 мл раствора внутреннего стандарта и доводят объем раствора тем же растворителем до метки.

1,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью

10 мл, содержащую 7 мл раствора внутреннего стандарта и доводят объем раствора тем же растворителем до метки. Раствор используют свежеприготовленным.

Холостой раствор. Раствор внутреннего стандарта, используемый для анализа.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка\* | капиллярная 60 м × 0,32 мм (100 % полиэтиленгликоль, модифицированный модифицированныйнитротерефталевой кислотой), толщина покрытия 0,5 мкм |
| Газ-носитель | азот, скорость потока – 1,1 мл/мин, деление потока – 1 : 60 |
| Объём пробы | 1 мкл |
| Температура | колонка | 15 °С/мин | 70 → 150 °С |
|  |  | 40 °С/мин | нагрев до 200 °С |
|  |  | 13 мин | выдержка при 200 °С |
|  | инжектор |  | 200 °С |
|  | детектор |  | 220 °С |
| Скорость водорода | 20 мл/мин |
| Скорость воздуха | 200 мл/мин |
| Время хроматографирования | 20 мин |

Хроматографируют попеременно испытуемый и стандартный растворы, получая не менее трех хроматограмм каждого.

Порядок выхода пиков: пик диоксана и пик уксусной кислоты.

Результаты анализа считаются достоверными, если выполняются требования теста «Проверка пригодности хроматографической системы».

*Проверка пригодности хроматографической системы*

Регистрируют не менее пяти последовательных хроматограмм стандартного раствора.

Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

- эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику уксусной кислоты, не менее 5000 теоретических тарелок;

- фактор асимметрии пика уксусной кислоты от 0,8 до 2,0;

- разрешение между пиками диоксана и уксусной кислоты не

менее 2,0;

- относительное стандартное отклонение отношения площади пика

уксусной кислоты к площади пика внутреннего стандарта не более 5,0 %.

Анализ холостого раствора проводят один раз. На хроматограмме холо­стого раствора не должно обнаруживаться пиков, по времени удерживания совпадающих с определяемыми компонентами.

*Учет результатов*

Среднее значение отношения площади пика уксусной кислоты к диоксану (К, Ко) вычисляют по формуле:

$$K=\frac{S}{Sd}; Ko=\frac{So}{Sod}, где$$

К, Ко - поправочные коэффициенты для испытуемого и стандартного

растворов соответственно;

S, Sо - средняя площадь пика уксусной кислоты на хроматограммах испытуемых и стандартных растворов соответственно;

Sd, Sоd  - средняя площадь пика диоксана на хроматограммах испытуемых и стандартных растворов соответственно.

Содержание уксусной кислоты в субстанции (*Хук*, %) вычисляют по формуле:

$$Xук=\frac{K∙a\_{0}∙10∙1}{K\_{0}∙a∙50∙10}∙100=\frac{K∙a\_{0}∙2}{K\_{0}∙a}, где$$

a - навеска субстанции, г;

a0- навеска уксусной кислоты, г.

Содержание уксусной кислоты в субстанции должно быть не менее 0,5 % и не более 5,0 %.

**Бактериальные эндотоксины.** Не более 250 ЕЭ/мг субстанции. Испытуемый раствор субстанции с концентрацией 1 мг/мл разводят не менее, чем в 300 раз. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Бактериальные эндотоксины».

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

**Количественное определение.** Испытание проводят методом ВЭЖХ в соответствии с ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография» в условиях испытания «Родственные примеси» со следующими изменениями.

*Подвижная фаза А (ПФА).* 21,1 г натрия перхлората растворяют в 950 мл воды, доводят pH раствора фосфорной кислотой концентрированной до (2,0 ± 0,02). Раствор переносят в мерную колбу вместимостью 1000 мл, доводят объем раствора во­дой до метки, фильтруют и дегазируют. Раствор используют свежеприготовленным.

*Подвижная фаза Б (ПФБ).* В мерную колбу вместимостью 500 мл помещают 150 мл ПФА, доводят объем раствора ацетонитрилом для хроматографии до метки, фильтруют и дегазируют. Раствор используют свежеприготовленным.

*Испытуемый раствор.* Около 5 мг (точная навеска) субстанции помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, растворяют в 5 мл ПФА и доводят объем раствора тем же растворителем до метки. Раствор используют свежеприготовленным.

*Раствор стандартного образца.* Около 8,5 мг (точная навеска) стандартного образца аланил-аспартил-глутамил-лейцина, аспартил-глутамил-аргинина, аспартил-глутамил-глицина, аспартил-глутамил-пролина и 16,5 мг стандартного образца лизил-аспартил-глутаминовой кислоты помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, растворяют в 5 мл ПФА, при необходимости обрабатывают ультразвуком, и доводят объем раствора тем же растворителем до метки.

1,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл и доводят объем раствора ПФАдо метки. Раствор используют свежеприготовленным.

Холостой раствор. Подвижная фаза А (ПФА).

Хроматографируют раствор стандартного образца, получая не менее трех хромато­грамм в условиях, описанных в разделе «Родственные примеси».

*Пригодность хроматографической системы*

Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия для всех пиков смеси:

- эффективность хроматографичекой колонки не менее 3000 теоретических тарелок;

- фактор асимметрии не более 2,0;

- относительное стандартное отклонение площадей пиков не более

1,0 %,

- относительное стандартное отклонение времен удерживания пиков не более 2,0 %;

- разрешение между пиками аспартил-глутамил-глицина и лизил-аспартил-глутаминовой кислоты не менее 2,0.

Регистрируют не менее трех хроматограмм испытуемого раствора.

Содержание каждого компонента в субстанции в пересчёте на безвод­ное, свободное от органических растворителей и уксусной кислоты, вещество (*Х*, мг/г) вычисляют по формуле:

$$X=\frac{S∙a\_{0}∙P ∙100}{S\_{0}∙a∙(100-W)}, где$$

S - средняя площадь соответствующего пика на хроматограммах испытуемого раствора;

So - средняя площадь соответствующего пика на хроматограммах

раствора стандартного образца;

ao - навеска соответствующего стандартного образца, г;

a - навеска субстанции, г;

Р - содержание основного вещества в соответствующем стандартном образце, %;

W - содержание воды, остаточных органических растворителей и

уксусной кислоты в испытуемом образце, %.

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