

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Аланил-аспартил-глутамил-лейцин+Аспартил-глутамил-аргинин
+Аспартил-глутамил-глицин +Аспартил-глутамил-пролин +Лизил-аспартил-глутаминовая кислота

ФС.2.1.0221.22

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 $C_{18}H_{30}N_4O_9 \cdot C_2H_4O_2$ (М.м. 506,5);

- L- α -аспартил-L- α -глутамиларгинина ацетат $C_{15}H_{26}N_6O_8 \cdot C_2H_4O_2$ (М.м. 478,5);

- L- α -аспартил- L- α -глутамилглицина ацетат $C_{11}H_{17}N_3O_8 \cdot C_2H_4O_2$ (М.м. 379,32);

- L- α -аспартил- L- α -глутамилпролина ацетат $C_{14}H_{21}N_3O_8 \cdot C_2H_4O_2$ (М.м. 419,4);

- L-лизил-L- α -аспартилглутаминовой кислоты ацетат $C_{15}H_{26}N_4O_8 \cdot C_2H_4O_2$ (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 ($C_{11}H_{17}N_3O_8$);
- лизил-аспартил-глутаминовая кислота – от 316,65 до 349,99 мг/г ($C_{15}H_{26}N_4O_8$);
- аспартил-глутамил-аргинин – от 158,33 до 175,00 мг/г ($C_{15}H_{26}N_6O_8$);
- аспартил-глутамил-пролин – от 158,33 до 175,00 мг/г ($C_{14}H_{21}N_3O_8$);
- аланил-аспартил-глутамил-лейцин – от 158,33 до 175,00 мг/г ($C_{18}H_{30}N_4O_9$).

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»).

2. *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 г натрия перхлората растворяют в 950 мл воды, доводят рН раствора фосфорной кислотой концентрированной до $(2,0 \pm 0,02)$. Раствор переносят в мерную колбу вместимостью 1000 мл, доводят объем раствора водой до метки, перемешивают, фильтруют и дегазируют. Раствор используют свежеприготовленным.

Подвижная фаза В (ПФВ). 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	250 x 4,6 мм; силикагель октадецилсилильный для хроматографии (С18), 5 мкм
Температура колонки	(35 ± 2) °С
Скорость потока	1,0 мл/мин
Детектор	УФ-детектор, 200 нм
Объем пробы	20 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 ($X_i, \%$) и сумму примесей ($X, \%$) в субстанции рассчитывают по формуле:

$$X_i (X) = \frac{S \cdot a_0 \cdot P \cdot 100}{S_0 \cdot a \cdot 25 \cdot (100 - W)}, \text{ где}$$

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

S_0 - средняя площадь пика аспартил-глутамил-аргинина на хроматограмме раствора сравнения;

a - навеска субстанции, г;

a_0 - навеска стандартного образца аспартил-глутамил-аргинина в растворе сравнения, г;

P - 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 неидентифицированных 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 кислоты 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 нитротерефталевой кислотой), толщина покрытия 0,5 мкм		
Газ-носитель	азот, скорость потока – 1,1 мл/мин, деление потока – 1 : 60		
Объем пробы	1 мкл		
Температура	колодка	15 °С/мин 40 °С/мин	70 → 150 °С 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 (K , K_0) вычисляют по формуле:

$$K = \frac{S}{Sd}; K_0 = \frac{S_0}{S_{0d}}, \text{ где}$$

K , K_0 - поправочные коэффициенты для испытуемого и стандартного растворов соответственно;

S , S_0 - средняя площадь пика уксусной кислоты на хроматограммах испытуемых и стандартных растворов соответственно;

S_d , S_{0d} - средняя площадь пика диоксана на хроматограммах испытуемых и стандартных растворов соответственно.

Содержание уксусной кислоты в субстанции ($X_{ук}$, %) вычисляют по формуле:

$$X_{ук} = \frac{K \cdot a_0 \cdot 10 \cdot 1}{K_0 \cdot a \cdot 50 \cdot 10} \cdot 100 = \frac{K \cdot a_0 \cdot 2}{K_0 \cdot a}, \text{ где}$$

a - навеска субстанции, г;

a_0 - 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 рН раствора фосфорной кислотой концентрированной до $(2,0 \pm 0,02)$. Раствор переносят в мерную колбу вместимостью 1000 мл, доводят объем раствора водой до метки, фильтруют и дегазируют. Раствор используют свежеприготовленным.

Подвижная фаза В (ПФВ). 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 ПФА до 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 хроматографической 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 (X , мг/г) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S \cdot a_0 \cdot P \cdot 100}{S_0 \cdot a \cdot (100 - W)}, \text{ где}$$

S - средняя площадь соответствующего пика на хроматограммах испытуемого раствора;

S_0 - средняя площадь соответствующего пика на хроматограммах раствора стандартного образца;

a_0 - навеска соответствующего стандартного образца, г;

a - навеска субстанции, г;

P - 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».