**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |
| --- |
|  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Аспарагиновая кислота** |  | **ФС** |
| **Аспарагиновая кислота** |  |  |
| **Acidum asparticum** |  | **Вводится впервые** |

|  |
| --- |
|  |

|  |
| --- |
|  |
| C4H7NO4 | М.м. 133,10 |
| [56-84-8] |  |

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

(2*S*)-2-Аминобутандиовая кислота.

L-Аспарагиновая кислота.

Cодержит не менее 98,5 % и не более 101,5 % аспарагиновой кислоты C4H7NO4 в пересчёте на сухое вещество.

СВОЙСТВА

**Описание**. Белый или почти белый кристаллический порошок или бесцветные кристаллы.

**Растворимость**. Мало растворим в воде, практически нерастворим в спирте 96 %.

\*Растворяется в разбавленных растворах минеральных кислот и щелочей.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ

*1. ИК-спектрометрия* (ОФС «Спектрометрия в средней инфракрасной области»). Инфракрасный спектр субстанции в области от 4000 до 400 см–1 по положению полос поглощения должен соответствовать спектру фармакопейного стандартного образца аспарагиновой кислоты.

*2. ТСХ* (ОФС «Тонкослойная хроматография»).

Вещества, окрашивающиеся нингидрином.

Пластинка. ТСХ пластинка со слоем силикагеля.

Подвижная фаза (ПФ). Уксусная кислота ледяная—вода—бутанол 20:20:60.

*Испытуемый раствор*. В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 10 мг субстанции, растворяют в аммиака растворе 10 % и доводят объём раствора водой до метки.

*Раствор стандартного образца аспарагиновой кислоты.* В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 10 мг фармакопейного стандартного образца аспарагиновой кислоты, растворяют в 2 мл аммиака раствора 10 % и доводят объём раствора водой до метки.

На линию старта пластинки наносят по 5 мкл испытуемого раствора и раствора стандартного образца аспарагиновой кислоты. Пластинку с нанесёнными пробами сушат на воздухе, помещают в камеру с ПФ и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт ПФ пройдёт около 80–90 % длины пластинки от линии старта, её вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей, опрыскивают нингидрина раствором 0,2 %, выдерживают в сушильном шкафу при температуре 100–105 °С в течение 15 мин и просматривают в видимом свете.

Основная зона адсорбции на хроматограмме испытуемого раствора, по положению, величине и окраске должна соответствовать зоне адсорбции аспарагиновой кислоты на хроматограмме раствора стандартного образца аспарагиновой кислоты.

ИСПЫТАНИЯ

**Удельное вращение**. От +24,0 до +26,0 в пересчёте на сухое вещество (8 % раствор субстанции в хлористоводородной кислоты растворе 6 М, ОФС «Оптическое вращение»).

**Прозрачность раствора**. Раствор 0,5 г субстанции в 10 мл хлористоводородной кислоты растворе 1 М должен быть прозрачным (ОФС «Прозрачность и степень опалесценции (мутности) жидкостей»).

**Цветность раствора**. Раствор, полученный в испытании «Прозрачность раствора», должен выдерживать сравнение с эталоном BY6 (ОФС «Степень окраски жидкостей», метод 2).

**pH**. От 2,5 до 3,5 (0,5 г субстанции растворяют в 100 мл кипящей воды и охлаждают, ОФС «Ионометрия», метод 3).

**Родственные примеси**

***1.* *Энантиомерная чистота*.** Определение проводят методом ВЭЖХ (ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография»).

Все растворы используют свежеприготовленными.

*Подвижная фаза (ПФ):* 2-пропанол—меди сульфата пентагидрата раствор 0,5 г/л 5:95 (об*/*об).

*Испытуемый раствор*. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 0,10 г (точная навеска) субстанции, растворяют в воде и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

*Раствор стандартного образца примеси I*.В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 0,10 г (точная навеска) фармакопейного стандартного образца D-аспарагиновой кислоты (примесь I), растворяют в воде и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

*Раствор сравнения.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 0,3 мл раствора стандартного образца примеси I и доводят объём раствора водой до метки.

*Раствор для проверки разделительной способности хроматографической системы.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 0,10 г (точная навеска) субстанции, растворяют в 90 мл воды, прибавляют 0,3 мл раствора сравнения и доводят объём раствора водой до метки.

Примечание

Примесь I (D-аспарагиновая кислота): (2*R*)-2-аминобутандиовая кислота [1783-96-6].

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 150 × 4,6 мм, силикагель для хиральной хроматографии, модифицированный L-пеницилламином, 5 мкм; |
| Температура колонки | 30 °С; |
| Скорость потока | 1,0 мл/мин; |
| Детектор | спектрофотометрический, 230 нм; |
| Объём пробы | 20 мкл; |
| Время хроматографирования | 24мин. |

Хроматографируют раствор для проверки разделительной способности хроматографической системы, раствор стандартного образца примеси I, раствор сравнения и испытуемый раствор.

*Относительное время удерживания* *соединений.* Аспарагиновая кислота – 1 (около 12 мин); примесь I – около 0,85.

*Пригодность хроматографической системы.* На хроматограмме раствора для проверки разделительной способности хроматографической системы *разрешение (RS)* между пиками примеси I и аспарагиновой кислоты должно быть не менее 2,0.

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

$$X=\frac{a\_{o}∙S\_{1}∙P∙100∙0,3}{a\_{1}∙S\_{o}∙100∙100} ,$$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | $$S\_{1}$$ | – | площадь пика примеси I на хроматограмме испытуемого раствора; |
|  | $$S\_{o}$$ | – | площадь пика примеси I на хроматограмме раствора сравнения; |
|  | $$a\_{1}$$ | – | навеска субстанции, мг; |
|  | $$a\_{o}$$ | – | навеска фармакопейного стандартного образца примеси I, мг; |
|  | $$P$$ | – | содержание примеси I в фармакопейном стандартном образце примеси I, %. |

Допустимое содержание примеси I не более 0,3 %.

***2. Другие дикарбоновые кислоты.***Определение проводят методом ВЭЖХ (ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография»).

Все растворы используют свежеприготовленными.

*Подвижная фаза (ПФ)*. В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 900 мл воды, прибавляют 4,0 мл серной кислоты раствора 3,8 М, доводят объём раствора водой до метки.

*Испытуемый раствор*. В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 0,5 г (точная навеска) субстанции, прибавляют 2 мл хлористоводородной кислоты раствора 6 М и встряхивают до полного растворения в течение 10–20 мин, доводят объём раствора водой до метки.

*Раствор яблочной кислоты (А)*. В мерную колбу вместимостью 20 мл помещают 20 мг (точная навеска) яблочной кислоты (примесь А), растворяют в воде и доводят объём раствора водой до метки.

*Раствор яблочной кислоты (Б)*. В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 1,0 мл раствора яблочной кислоты (А) и доводят объём раствора водой до метки.

*Раствор малеиновой кислоты*. В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 10 мг (точная навеска) малеиновой кислоты (примесь Н), растворяют в воде и доводят объём раствора водой до метки. В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 1,0 мл полученного раствора и доводят объём раствора водой до метки.

*Раствор фумаровой кислоты*. В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 10 мг (точная навеска) фумаровой кислоты (примесь B), растворяют в воде и доводят объём раствора водой до метки. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 1,0 мл полученного раствора и доводят объём раствора водой до метки.

*Раствор для проверки разделительной способности хроматографической системы*. В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 1,0 мл раствора малеиновой кислоты и доводят объём раствором яблочной кислоты (А) до метки.

Примечание

Примесь А (яблочная кислота): (2*RS*)-2-гидроксибутандиовая кислота [6915-15-7].

Примесь В (фумаровая кислота): (2*E*)-бут-2-ендиовая кислота [110-17-8].

Примесь H (малеиновая кислота): (2*Z*)-бут-2-ендиовая кислота [110-16-7].

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 300 × 7,8 мм, сильная катионообменная смола, 9 мкм; |
| Температура колонки | 30 °С; |
| Скорость потока | 0,6 мл/мин; |
| Детектор | спектрофотометрический, 214 нм; |
| Объём пробы | 10 мкл; |
| Время хроматографирования | 4-кратное от времени удерживания пика примеси B. |

Хроматографируют раствор для проверки разделительной способности хроматографической системы, растворы яблочной кислоты (А и Б), растворы малеиновой и фумаровой кислот и испытуемый раствор.

*Относительное время удерживания соединений.* Примесь H – 1 (около 7,5 мин); примесь А – около 1,2; примесь B – около 2,0.

*Идентификация примесей*. Для идентификации пиков примесей используют относительное время удерживания соединений, хроматограмму раствора для проверки разделительной способности хроматографической системы(примеси A и H) и хроматограмму раствора фумаровой кислоты (примесь B).

*Пригодность хроматографической системы.* На хроматограмме раствора для проверки разделительной способности хроматографической системы *разрешение (RS)* между пиками примеси H и примеси А должно быть не менее 1,5.

Содержание примеси А (яблочной кислоты) в субстанции в процентах ($X\_{А}$) вычисляют по формуле:

$$X\_{А}=\frac{S\_{1}∙a\_{0}∙P∙100∙1}{S\_{0}∙a\_{1}∙20∙10} ,$$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | $$S\_{1}$$ | – | площадь пика примеси А на хроматограмме испытуемого раствора; |
|  | *S*0 | – | площадь пика яблочной кислоты на хроматограмме раствора яблочной кислоты (Б); |
|  | *a* | – | навеска субстанции, мг; |
|  | *ɑ*0 | – | навеска яблочной кислоты, мг; |
|  | *P* | – | содержание основного вещества в яблочной кислоте, %. |

Содержание каждой из примесей В и Н в субстанции в процентах ($X\_{BH}$) вычисляют по формуле:

$$X\_{BH}=\frac{S\_{1}∙a\_{0}∙P∙100∙1}{S\_{0}∙a\_{1}∙10∙10} ,$$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | $$S\_{1}$$ | – | площадь пика примеси В или H на хроматограмме испытуемого раствора; |
|  | *S*0 | – | площадь пика малеиновой кислоты на хроматограмме раствора малеиновой кислоты; |
|  | *a* | – | навеска субстанции, мг; |
|  | *ɑ*0 | – | навеска малеиновой кислоты, мг; |
|  | *P* | – | содержание основного вещества в малеиновой кислоте, %. |

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

$$X\_{А}=\frac{S\_{1}∙a\_{0}∙P∙100∙1}{S\_{0}∙a\_{1}∙20∙10} ,$$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | $$S\_{1}$$ | – | площадь пика любой другой примеси на хроматограмме испытуемого раствора; |
|  | *S*0 | – | площадь пика яблочной кислоты на хроматограмме раствора яблочной кислоты (Б); |
|  | *a* | – | навеска субстанции, мг; |
|  | *ɑ*0 | – | навеска яблочной кислоты, мг; |
|  | *P* | – | содержание основного вещества в яблочной кислоте, %. |

*Допустимое содержание примесей*:

- примесь А – не более 0,2 %;

-  примесь B – не более 0,10 %;

-  примесь Н – не более 0,10 %;

- любая другая примесь – не более 0,10 %;

- сумма примесей – не более 0,3 %.

Не учитывают примеси, содержание каждой из которых менее 0,05 %.

***3. Нингидрин-положительные вещества.***Определение проводят в соответствии с ОФС «Аминокислотный анализ» (метод 1).

*Раствор A.* Хлористоводородной кислоты раствор 0,01 М или буферный раствор для пробоподготовки*,* подходящий для используемого прибора.

*Испытуемый раствор.* В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 30 мг (точная навеска) субстанции, растворяют в растворе A и доводят объём тем же растворителем до метки.

*Раствор сравнения.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 1,0 мл испытуемого раствора и доводят объём раствором A до метки. В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 2,0 мл полученного раствора и доводят объём раствором А до метки.

*Раствор пролина*. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 30 мг (точная навеска) пролина, растворяютв растворе A и доводят объём тем же растворителем до метки. В мерную колбу вместимостью 250 мл помещают 1,0 мл полученного раствора и доводят объём раствором А до метки.

*Стандартный раствор*. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 30 мг аланина (примесь D), 60 мг аспарагина (примесь G) и 30 мг глутаминовой кислоты (примесь С), растворяют в растворе А и доводят объём тем же растворителем до метки. В мерную колбу вместимостью 250 мл помещают 1,0 мл полученного раствора и доводят объём раствором А до метки.

*Раствор для проверки разделительной способности хроматографической системы*. В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 30 мг изолейцина и 30 мг лейцина, растворяют в растворе A и доводят объём тем же растворителемдо метки. В мерную колбу вместимостью 200 мл помещают 1,0 мл полученного раствора и доводят объём раствором А до метки.

*Контрольный раствор.* Раствор *A*.

Примечание

Примесь С (глутаминовая кислота): (2S)-2-аминопентандиовая кислота [56-86-0].

Примесь D (аланин): (2S)-2-аминопропановая кислота [56-41-7].

Примесь G (аспарагин): (2S)-2-амино-3-карбамоилпропановая кислота [70-47-3].

Вводят в аминокислотный анализатор подходящие равные объёмы контрольного раствора, раствора для проверки разделительной способности хроматографической системы, стандартного раствора, раствора пролина, раствора сравнения и испытуемого раствора. Используют программу элюирования, подходящую для определения содержания протеиногенных аминокислот.

*Пригодность хроматографической системы.* На хроматограмме раствора для проверки разделительной способности хроматографической системы разрешение *(RS)* между пиками изолейцина и лейцина должно быть не менее 1,5.

Содержание каждой из примесей C, D и G в субстанции в процентах (*Х*) вычисляют по формуле:

$$X=\frac{S\_{1}∙a\_{0}∙P∙50∙1}{S\_{0}∙a\_{1}∙100∙250} ,$$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | $$S\_{1}$$ | – | площадь пика примеси C, D или G на хроматограмме испытуемого раствора; |
|  | $$S\_{0}$$ | – | площадь пика примеси C, D или G на хроматограмме стандартного раствора; |
|  | $$a\_{1}$$ | – | навеска субстанции, взятая для приготовления испытуемого раствора, мг; |
|  | $$a\_{0}$$ | – | навеска фармакопейного стандартного образца примеси C, D или G, взятая для приготовления стандартного раствора, мг; |
|  | *P* | – | содержание основного вещества в фармакопейном стандартном образце примеси C, D или G соответственно, %. |

Содержание любого другой примеси (нингидрин-положительного вещества), зарегистрированной при длине волны 570 нм, ($X$) вычисляют по формуле:

$$X=\frac{S\_{1}∙50∙1∙2∙100}{S\_{0}∙50∙100∙10} ,$$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | $$S\_{1}$$ | – | площадь пика любой другой примеси на хроматограмме испытуемого раствора; |
|  | $$S\_{0}$$ | – | площадь основного пика на хроматограмме раствора сравнения. |

Содержание любой другой примеси (нингидрин-положительного вещества), зарегистрированной при длине волны 440 нм, ($X$) вычисляют по формуле:

$$X=\frac{S\_{1}∙a\_{0}∙P∙50∙1∙100}{S\_{0}∙a\_{1}∙100∙250} ,$$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | $$S\_{1}$$ | – | площадь пика любой другой примеси на хроматограмме испытуемого раствора; |
|  | $$S\_{0}$$ | – | площадь пика пролина на хроматограмме стандартного раствора; |
|  | $$a\_{1}$$ | – | навеска субстанции, мг; |
|  | $$a\_{0}$$ | – | навеска пролина, взятая для приготовления раствора пролина, мг; |
|  | $$P$$ | – | содержание основного вещества в фармакопейном стандартном образце пролина, %. |

Если примесь регистрируется выше порога игнорирования как при 570 нм, так и при 440 нм, для количественного расчёта используют результат, полученный при 570 нм.

*Допустимое содержание примесей*:

- примеси С, D и G – не более 0,2 % каждая;

- любая другая примесь – не более 0,10 %;

- сумма примесей – не более 1,0 %.

Не учитывают примеси, содержание каждой из которых менее 0,05 %.

**Потеря в массе при высушивании**. Не более 0,5 % (ОФС «Потеря в массе при высушивании», способ 1). Для определения используют 1 г (точная навеска) субстанции.

**Аммоний**. Не более 0,02 % (ОФС «Аммоний»). Взбалтывают 0,15 г субстанции с 15 мл воды свободной от аммиака в течение 5 мин и фильтруют. Для определения используют 10 мл фильтрата.

**Железо**. Не более 0,001 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Железо» (метод 2) в зольном остатке, полученном после сжигания 1,0 г субстанции (ОФС «Сульфатная зола»), с использованием железа стандартного раствора 10 мкг/мл.

**Сульфаты**. Не более 0,03 % (ОФС «Сульфаты», метод 1). В 4 мл хлористоводородной кислоты разведённой 8,3 % растворяют 0,5 г субстанции и доводят объём раствора водой до 15 мл. Для определения используют 10 мл раствора.

**Хлориды.** Не более 0,02 % (ОФС «Хлориды»). В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 0,25 г субстанции, прибавляют в 3 мл азотной кислоты раствора 12,5 %, доводят объём раствора водой до метки. Для определения используют 10 мл раствора.

**Сульфатная зола**. Не более 0,1 % (ОФС «Сульфатная зола»). Для определения используют 1 г (точная навеска) субстанции.

**Тяжёлые металлы**. Не более 0,001 %*.* Определение проводят в соответствии с ОФС «Тяжёлые металлы» (метод 2), в зольном остатке, полученном в испытании «Сульфатная зола», с использованием эталонного раствора 1.

**Остаточные органические растворители.** Всоответствии с ОФС «Остаточные органические растворители».

\*\***Аномальная токсичность**. Субстанция должна быть нетоксичной (ОФС «Аномальная токсичность»). Тест-доза – 7,5 мг субстанции в 0,5 мл натрия хлорида раствора 0,9 % на мышь, внутривенно в течение 30 с. Срок наблюдения – 48 ч. Испытуемый раствор с концентрацией 15 мг/мл: к навеске субстанции 900 мг прибавляют 3,4 мл раствора натрия гидроксида 2 М и нагревают до 90–100 °С до полного растворения субстанции, доводят объём раствора до 10 мл раствором натрия хлорида 0,9 %. К 1,0 мл полученного раствора прибавляют 5 мл раствора натрия хлорида 0,9 %.

\*\***Бактериальные эндотоксины**. Не более 10 ЕЭ на 1 г аспарагиновой кислоты (ОФС «Бактериальные эндотоксины»).

Для проведения испытания готовят исходный раствор субстанции с концентрацией 0,01 г субстанции в 1 мл воды для определения бактериальных эндотоксинов. При приготовлении исходного раствора допускается нагревание до температуры 70–80 °С, до полного растворения субстанции. Разведения исходного раствора субстанции выполняют с использованием растворов, корректирующих значение pH.

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

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Определение проводят методом титриметрии (ОФС «Титриметрия (титриметрические методы анализа)»).

Растворяют 0,1 г (точная навеска) субстанции (при слабом нагревании) в 50 мл воды, охлаждают и титруют 0,1 М раствором натрия гидроксида до перехода окраски из жёлтой в синюю (индикатор – 0,1 мл бромтимолового синего раствор 0,05 %).

Параллельно проводят контрольный опыт.

1 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида соответствует 13,31 мг аспарагиновой кислоты C4H7NO4.

ХРАНЕНИЕ

В плотно закрытой упаковке, в защищённом от света месте.

\*Приводится для информации

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