**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |
| --- |
|  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Глутатион** |  | **ФС.2.1.0399** |
| **Глутатион** |  |  |
| **Glutathionum** |  | **Вводится впервые** |

|  |
| --- |
|  |

|  |
| --- |
|  |
| C10H17N3O6S | М.м. 307,33 |
| [70-18-8] |  |

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

L-γ-Глутамил-L-цистеинилглицин.

Cодержит не менее 98,0 % и не более 101,0 % глутатиона C10H17N3O6S в пересчёте на сухое вещество.

СВОЙСТВА

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

**Растворимость.** Легко растворим в воде, очень мало растворим в этаноле 96 % и метиленхлориде.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ

*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 глутатиона.

ИСПЫТАНИЯ

**Удельное вращение.** От −15,5 до −17,5 в пересчёте на сухое вещество (4 % раствор субстанции в воде ОФС «Оптическое вращение»).

**Прозрачность раствора.** Раствор 5,0 г субстанции в 50 мл воды должен быть прозрачным (ОФС «Прозрачность и степень опалесценции (мутности) жидкостей»).

**Цветность раствора.** Раствор, полученный в испытании «Прозрачность раствора», должен быть бесцветным(ОФС «Степень окраски жидкостей», метод 2).

**Родственные примеси.** Определение проводят методом капиллярного электрофореза (ОФС «Капиллярный электрофорез»).

Все растворы используют сразу после приготовления.

*Ведущий электролит (ВЭ).* В мерную колбу вместимостью 250 мл помещают 1,5 г натрия дигидрофосфата безводного, растворяют в 230 мл воды, доводят значение рН фосфорной кислотой концентрированной до 1,8 и доводят объём раствора водой до метки.

*Раствор внутреннего стандарта А.* В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 0,1 г (точная навеска) фенилаланина, растворяют в ВЭ и доводят объём раствора ВЭ до метки.

*Раствор внутреннего стандарта Б.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 10,0 мл раствора внутреннего стандарта А и доводят объём раствора ВЭ до метки.

*Испытуемый раствор А.* В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 0,2 г (точная навеска) субстанции, растворяют в ВЭ и доводят объём раствора ВЭ до метки.

*Испытуемый раствор Б.* В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 0,2 г (точная навеска) субстанции, растворяют в растворе внутреннего стандарта Б и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

*Стандартный раствор.* В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 20 мг (точная навеска) субстанции, растворяют в растворе внутреннего стандарта А и доводят объём раствора тем же растворителем до метки. В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 1,0 мл полученного раствора и доводят объём раствора ВЭ до метки.

*Раствор для проверки пригодности электрофоретической системы.* В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают по 5 мг L-цистеина, глутатиона окисленного и L-γ-глутамил-L-цистеина, растворяют в ВЭ и доводят объём раствора ВЭ до метки. В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 0,2 г субстанции, растворяют в 5 мл ВЭ, прибавляют 1,0 мл раствора внутреннего стандарта А, 2,0 мл полученного раствора и доводят объём раствора ВЭ до метки.

*Контрольный раствор.* ВЭ.

Примечание

Примесь А: L-цистеинилглицин [19246-18-5].

Примесь В (L-цистеин): (2*R*)-2-амино-3-сульфанилпропановая кислота [52-90-4].

Примесь С (глутатион окисленный): (2→2')-бис(L-γ-глутамил-L-цистеинилглицин)дисульфид [27025-41-8].

Примесь D: L-γ-глутамил-L-цистеин [636-58-8].

Примесь E: неизвестная структура.

*Электрофоретические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Капилляр | кварцевая капиллярная, 50 см × 75 мкм; |
| Прекондиционирование нового капилляра | Растворитель | Время, мин | Давление, кПа |
| хлористоводородной кислоты раствор 0,1 М | 20 | 138; |
| вода | 10 | 138; |
| ВЭ | 40 | 350; |
| Для полного уравновешивания капилляра предыдущую стадию промывки повторяют при напряжении 20 кВ в течение 60 мин; |
| Прекондиционирование капилляра | ВЭ | 40 | 138; |
| Промывка капилляра | вода | 1 | 138; |
| натрия гидроксида раствор 0,1 М | 2 | 138; |
| вода | 1 | 138; |
| хлористоводородной кислоты раствор 0,1 М | 3 | 138; |
| ВЭ | 10 | 138; |
| Температура капилляра | 25 °C; |
| Детектор | спектрофотометрический, 200 нм; |
| Ввод пробы | 5 с·3,45 кПа; |
| Напряжение | 20 кВ; |
| Время анализа | 45 мин. |

Последовательно анализируют контрольный раствор, раствор для проверки пригодности электрофоретической системы, стандартный раствор, испытуемый раствор А и испытуемый раствор Б.

*Относительное время миграции.* Внутренний стандарт – 1 (около 14 мин); примесь А – около 0,77; примесь В – около 1,04; примесь Е – около 1,2; примесь С – около 1,26; примесь D – около 1,3.

*Пригодность электрофоретической системы.* На электрофореграмме испытуемого раствора А не должно быть пика, соответствующего по времени миграции пику внутреннего стандарта, при необходимости корректируют площадь внутреннего стандарта.

На электрофореграмме раствора для проверки пригодности электрофоретической системы:

- *разрешение (RS)* между пиками внутреннего стандарта и примеси В должно быть не менее 1,5, при необходимости увеличивают значение рН натрия гидроксида раствором 8,5 %;

- *отношение максимум/минимум (p/v)* между пиками примеси D и глутатиона должно быть не менее 2,5, при необходимости уменьшают значение рН фосфорной кислотой концентрированной.

*Поправочные коэффициенты.* Для расчёта содержания площади пиков следующих примесей умножают на соответствующие поправочные коэффициенты: примесь В – 3,0; примесь D – 1,4.

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

$$X=\frac{B\_{1}∙t\_{0}∙t\_{is}^{1}·100}{B\_{0}∙t\_{1}∙t\_{is}^{0}} ,$$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *B*1 | – | отношение площади пика любой примеси к площади пика внутреннего стандарта на электрофореграмме испытуемого раствора (Б);  |
|  | *B*0 | − | отношение площади пика глутатиона к площади пика внутреннего стандарта на электрофореграмме стандартного раствора; |
|  | *t*1 | − | время миграции соответствующей примеси на электрофореграмме испытуемого раствора (Б), мин; |
|  | *t*0 | − | время миграции глутатиона на электрофореграмме стандартного раствора, мин; |
|  | $$t\_{is}^{1}$$ | − | время миграции внутреннего стандарта на электрофореграмме испытуемого раствора (Б), мин; |
|  | $$t\_{is}^{0}$$ | − | время миграции внутреннего стандарта на электрофореграмме стандартного раствора, мин. |

*Допустимое содержание примесей:*

- примеси А, В, Е – не более 0,5 % каждая;

- примесь С – не более 1,5 %;

- примесь D – не более 1,0 %;

- любая другая примесь – не более 0,2 %;

- сумма примесей – не более 2,5 %.

Не учитывают примеси, содержание каждой из которыхменее 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 %

*Стандартный раствор аммония.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 74,1 мг (точная навеска) аммония хлорида, растворяют в воде и доводят объём раствора тем же растворителем до метки. В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 10,0 мл полученного раствора. Раствор готовится непосредственно перед использованием.

*Испытуемый раствор*. В коническую колбу с притёртой пробкой вместимостью 25 мл помещают 50 мг субстанции, растворяют в 1 мл воды, прибавляют 0,3 г магния оксида и перемешивают.

*Эталонный раствор*. В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 0,1 мл стандартного раствора аммония, прибавляют 1 мл воды, 0,3 г магния оксида и перемешивают.

Над реакционными смесями испытуемого и эталонного растворов подвешивают по полоске полиэтилена шириной 1 см с прикреплёнными несколькими каплями воды отрезками серебряно-марганцевой бумаги, и закрывают колбы пробками. Содержимое колб перемешивают, не допуская попадания брызг на бумагу, и выдерживают на водяной бане при температуре 40 ºС в течение 30 мин. Окраска бумаги, используемой в испытуемом растворе, не должна быть интенсивнее окраски бумаги, используемой в эталонном растворе.

**Железо.** Не более 0,001 % (ОФС «Железо»,метод 2).

*Испытуемый раствор.* В делительную воронку помещают 1 г (точная навеска) субстанции, растворяют в 10 мл хлористоводородной кислоты разведённой 7,3 %, экстрагируют тремя порциями метилизобутилкетона по 10 мл, каждый раз встряхивая в течение 3 мин. Объединяют органические извлечения, прибавляют 10 мл воды и встряхивают в течение 3 мин. Используют водный слой.

**Сульфаты.** Не более 0,03 % (ОФС «Сульфаты», метод 2).

*Испытуемый раствор.*Смешивают 5 млраствора, полученного в испытании «Прозрачность раствора», и 15 мл воды.

**Хлориды.** Не более0,02 % (ОФС «Хлориды»).

*Испытуемый раствор.* В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 0,5 г (точная навеска) субстанции, растворяют в азотной кислоте разведённой 12,5 % и доводят объём раствора тем же растворителем до метки. В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 10,0 мл полученного раствора, прибавляют 10 мл водорода пероксида, нагревают на водяной бане в течение 30 мин, охлаждают до комнатной температуры и доводят объём раствора водой до метки.

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

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

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ

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

В коническую колбу с притёртой пробкой помещают 0,5 г (точная навеска) субстанции, 2,0 г калия йодида растворяют в 50 мл воды, охлаждают на ледяной бане, прибавляют 10,0 мл хлористоводородной кислоты 25 %, 20,0 мл йода раствора 0,05 М, закрывают колбу пробкой и выдерживают в тёмном месте в течение 15 мин, титруют натрия тиосульфата раствором 0,1 М. Индикатор прибавляют ближе к концу титрования (индикатор – 1,0 мл крахмала раствор 1 %, содержащий 0,01 % ртути(II)).

Параллельно проводят контрольный опыт.

1 мл раствора йода 0,05М соответствует 30,73 мг глутатиона C10H17N3O6S.

ХРАНЕНИЕ

В защищённом от света месте.