**Метотрексат ФС**

**Метотрексат**

**Methotrexatum Взамен ФС 42-1592-88**

(2*S*)-2-(4-{[(2,4-Диаминоптеридин-6-ил)метил](метил)амино}бензамидо)пентандиовая кислота



|  |  |
| --- | --- |
| C20H22N8O5 | М.м. 454,4 |

Cодержит не менее 97,0 % и не более 102,0 % метотрексата C20H22N8O5 в пересчете на безводное и свободное от остаточных растворителей вещество.

**Описание**. Жёлтый или оранжевый кристаллический порошок. \*Гигроскопичен.

**Растворимость**. Практически нерастворим в воде, спирте 96 %, метиленхлориде. Растворим 2 % растворе гидроксида натрия и 2 % растворе хлористоводородной кислоты.

**Подлинность**. *1. ИК-спектрометрия*. 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 метотрексата.

*2. Спектрофотометрия*. Cпектр поглощения 0,001 % раствора субстанции в 0,1 М растворе хлористоводородной кислоты в области длин волн от 230 до 380 нм должен соответствовать спектру аналогичного раствора стандартного образца и иметь максимумы при 258 нм, 302 нм и 371 нм. Отношение оптической плотности при длине волны 302 нм к оптической плотности при длине волны 371 нм должно находиться в интервале от 2,8 до 3,2.

**Удельное вращение**. От +19 до +24 в пересчете на безводное вещество (1 % раствор субстанции в 0,05 М растворе карбоната натрия, ОФС «Поляриметрия»).

**Прозрачность раствора**. Раствор 50 мг субстанции в 10 мл 0,05 М раствора карбоната натрия должен быть прозрачным (ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей»).

**Родственные примеси**.

*1. Примесь F (R-изомер)*. Определение проводят методом ВЭЖХ.

*Подвижная фаза (ПФ)*. К 600 мл 0,05 М раствора натрия дигидрофосфата прибавляют 500 мл 0,05 М раствора динатрия гидрофосфата, доводят pH раствора до 6,9 прибавлением 8,5 % раствора гидроксида натрия. К 920 мл полученного раствора прибавляют 80 мл метанола.

*Испытуемый раствор*. Около 0,2 г субстанции помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в *ПФ* и доводят объём раствора до метки тем же растворителем.

*Раствор сравнения*. 1,0 мг *испытуемого раствора* помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят объём раствора *ПФ* до метки.

*Раствор для проверки хроматографической системы*. Около 4,0 мг стандартного образца метотрексата для проверки хроматографической системы (содержащего примесь F) помещают в мерную колбу вместимостью 20 мл, растворяют в *ПФ* и доводят объём раствора до метки тем же растворителем.

Примечание:

примесь F: (2*R*)-2-(4-{[(2,4-диаминоптеридин-6-ил)метил](метил)амино}бензамидо)пентандиовая кислота (CAS 51865-79-3).

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 15 × 0,39 см, модифицированный альбумином для хиральной хроматографии, 7 мкм, размер пор 30 нм; |
| Температура колонки | 25 °С; |
| Скорость потока | 1,5 мл/мин; |
| Детектор | спектрофотометрический, 302 нм; |
| Объём пробы | 20 мкл; |

Хроматографируют *испытуемый раствор*, *раствор сравнения* и *раствор для проверки пригодности хроматографической системы*.

*Относительные времена удерживания*. Метотрексат – 1 (около 4 мин); примесь F – около 1,6.

*Пригодность хроматографической системы*:

на *хроматограмме раствора для проверки пригодности хроматографической системы*:

– *разрешение (R)* между пиками метортрексата и примеси F должно быть не менее 2,0;

*Допустимое содержание примеси F*. На хроматограмме *испытуемого раствора*:

– площадь пика примеси F не должна превышать трёхкратную площадь основного пика на хроматограмме *раствора сравнения* (не более 3,0 %).

*2. Другие примеси*. Определение проводят методом ВЭЖХ.

*Буферный раствор*. 3,4 г натрия дигидрофосфата растворяют в воде и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл. Доводят рН до 6,0 потенциометрически 1 М раствором гидроксида натрия.

*Подвижная фаза А (ПФА)*. Ацетонитрил–буферный раствор 1:19.

*Подвижная фаза Б (ПФБ)*. Ацетонитрил–буферный раствор 1:1.

*Испытуемый раствор*. 40,0 мг субстанции помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в смеси 0,5 мл 10 % раствора аммиака и 5 мл *ПФА,* и доводят объём раствора *ПФА* до метки.

*Раствор сравнения А*. 5,0 мл испытуемого раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят объём раствора *ПФА* до метки. 5,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят объём раствора *ПФА* до метки.

*Раствор сравнения Б*. 5,0 мл раствора сравнения А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят объём раствора *ПФА* до метки.

*Раствор сравнения В*. 5,0 мг субстанции, 5,0 мг 4-аминофолиевой кислоты (примесь B), 5,0 мг стандартного образца примеси C, 5,0 мг стандартного образца примеси D и 5,0 мг стандартного образца примеси E помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в смеси 0,5 мл 10 % раствора аммиака и 5 мл *ПФА,* и доводят объём раствора *ПФА* до метки.

*Раствор для идентификации пиков*. 8,0 мг стандартного образца метотрексата для идентификации пиков (содержащего примеси H и I) помещают в мерную колбу вместимостью 20 мл, растворяют в смеси 0,1 мл 10 % раствора аммиака и 1 мл *ПФА,* и доводят объём раствора *ПФА* до метки.

Примечание:

примесь C: (2*S*)-2-(4-{[(2-амино-4-оксо-1,4-дигидроптеридин-6-ил)метил](метил)амино}бензамидо)пентандиовая кислота (CAS 2410-93-7);

примесь D: 4-{[(2-амино-4-оксо-1,4-дигидроптеридин-6-ил)метил](метил)амино}бензойная кислота (CAS 5623-18-7);

примесь E: 4-{[(2,4-диаминоптеридин-6-ил)метил](метил)амино}бензойная кислота (CAS 19741-14-1);

примесь H: (2*S*)-2-(4-{[(2,4-диаминоптеридин-6-ил)метил](метил)амино}бензамидо)-5-метокси-5-оксопентановая кислота (CAS 67022-39-3);

примесь I: (4*S*)-4-(4-{[(2,4-диаминоптеридин-6-ил)метил](метил)амино}бензамидо)-5-метокси-5-оксопентановая кислота (CAS 66147-29-3).

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 25 × 0,39 см, силикагель октадецилсилильный для хроматографии (С18), 5 мкм; |
| Температура колонки | 25 °С; |
| Скорость потока | 1,5 мл/мин; |
| Детектор | спектрофотометрический, 280 нм; |
| Объём пробы | 20 мкл; |

Хроматографируют испытуемый раствор, растворы сравнения А, Б и В и раствор для идентификации пиков.

*Относительные времена удерживания*. Метотрексат – 1 (около 18 мин); примесь B – около 0,3; примесь C – около 0,4; примесь D – около 0,9; примесь E – около 1,4; примесь I – около 1,5, примесь H – около 1,6.

*Пригодность хроматографической системы*:

на хроматограмме раствора сравнения В:

– *разрешение (R)* между пиками примесей B и C должно быть не менее 2,0;

– *разрешение (R)* между пиками примеси C и метотрексата должно быть не менее 1,5;

на хроматограмме раствора сравнения В:

– *разрешение (R)* между пиками примесей I и H должно быть не менее 1,5.

Если разрешение между пиками примеси D и метотрексата менее требуемого, следует увеличить скорость потока.

*Поправочные коэффициенты*. Для расчёта содержания площади пиков следующих примесей умножаются на соответствующие поправочные коэффициенты: примесь E – 0,8; примесь I – 1,4.

*Допустимое содержание примесей*. На хроматограмме испытуемого раствора:

– площадь пика примеси C не должна превышать площадь основного пика на хроматограмме раствора сравнения А (не более 0,5 %);

– площади пиков примесей B и E не должны превышать 0,6 площади основного пика на хроматограмме раствора сравнения А каждая (не более 0,3 %);

– площади пиков примесей H и I не должны превышать двукратной площади основного пика на хроматограмме раствора сравнения Б каждая (не более 0,2 %);

– площадь пика любой другой примеси не должна превышать половину площади основного пика на хроматограмме раствора сравнения Б (не более 0,05 %);

– суммарная площадь пиков всех примесей, за исключением примесей B, C и E, не должна превышать площадь основного пика на хроматограмме раствора сравнения А (не более 0,5 %).

Не учитывают пики, площадь которых составляет менее 0,3 площади основного пика на хроматограмме раствора сравнения Б (менее 0,03 %).

**Вода**. Не более 13,0 % (ОФС «Определение воды», метод 1). Для определения используют около 0,10 г (точная навеска) субстанции.

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

**Тяжёлые металлы**. Не более 0,001 %*.* Определение проводят в соответствии с ОФС «Тяжёлые металлы», метод 2, в зольном остатке, полученном после сжигания 1,0 г субстанции, с использованием эталонного раствора 1.

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

**\*\*Пирогенность**. Субстанция должна быть апирогенной (ОФС «Пирогенность»). Тест-доза: 0,5 мг субстанции в 1,0 мл 0,9 % раствора натрия хлорида (воды для инъекций) на 1 кг массы кролика.

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

**Количественное определение**. Определение проводят методом ВЭЖХ в условиях испытания «Родственные примеси. 2. Другие примеси» со следующими изменениями.

*Испытуемый раствор*. 25,0 мг (точная навеска) субстанции помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в смеси 0,5 мл 10 % раствора аммиака и 5 мл *ПФА,* и доводят объём раствора *ПФА* до метки. 5,0 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят объём раствора *ПФА* до метки.

*Раствор стандартного образца*. 25,0 мг (точная навеска) стандартного образца метотрексата помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в смеси 0,5 мл 10 % раствора аммиака и 5 мл *ПФА,* и доводят объём раствора *ПФА* до метки. 5,0 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят объём раствора *ПФА* до метки.

*Пригодность хроматографической системы*:

на хроматограмме раствора стандартного образца:

– *фактор асимметрии* пика (*AS*) метотрексата должен быть не более 1,5;

– *относительное стандартное отклонение* площади пика метотрексата должно быть не более 2,0 % (6 определений);

– *эффективность хроматографической колонки (N)*, рассчитанная по пику метотрексата, должна составлять не менее 5000 теоретических тарелок.

Содержание метотрексата C20H22N8O5 в субстанции в процентах (*X*) в пересчете на безводное и свободное от остаточных органических растворителей вещество вычисляют по формуле:

$$X=\frac{S\_{1}∙a\_{0}∙5∙50∙50∙P∙100}{S\_{0}∙a\_{1}∙50∙50∙5∙(100-W)}=\frac{S\_{1}∙a\_{0}∙P∙100}{S\_{0}∙a\_{1}∙(100-W)}$$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *S*1 | – | площадь пика метотрексата на хроматограмме испытуемого раствора; |
|  | *S*0 | – | площадь пика метотрексата на хроматограмме раствора стандартного образца; |
|  | *а*1 | – | навеска субстанции, мг; |
|  | *а*0 | – | навеска стандартного образца метотрексата, мг; |
|  | *W* | – | суммарное содержание воды и остаточных органических растворителей в субстанции, %; |
|  | *P* | – | содержание метотрексата в стандартном образце метотрексата, %. |

**Хранение**. В плотно закрытой упаковке в защищённом от света месте при температуре не выше 20 °С.

\*Приводится для информации.

\*\*Контроль по показателю качества «Пирогенность» проводят в субстанции, предназначенной для производства лекарственных препаратов для парентерального применения.