|  |
| --- |
|  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Аллопуринол** |  | **ФС** |
| **Аллопуринол** |  |  |
| **Allopurinolum** |  | **Взамен ФС 42-2408-99** |

|  |
| --- |
|  |

|  |  |
| --- | --- |
| 1,5-Дигидро-4*H-*пиразоло[3,4-*d*]пиримидин-4-он | |
|  | |
| C5H4N4O | М.м.136,11 |

Cодержит не менее 97,0 % и не более 102,0 % аллопуринолаC5H4N4Oв пересчёте на сухое вещество.

**Описание.** Белый или почти белый мелкокристаллический порошок.

**Растворимость**. Легко растворим в натрия гидроксида растворе 10 %, умеренно растворим в диметилсульфоксиде, очень мало растворим в воде и спирте 96 %.

**Подлинность**

*1.**ИК-спектрометрия* (ОФС «Спектрометрия в инфракрасной области»)*.* Инфракрасный спектр субстанции, снятый в диске с калия бромидом, в области от 4000 до 400 см-1по положению полос поглощения должен соответствовать спектру стандартного образца аллопуринола.

*2.* *Спектрофотометрия* (ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях»). Спектр поглощения испытуемого раствора в области длин волн от 220 до 350 нм должен иметь максимумы при 250 нм и минимум при 231 нм. Отношение оптических плотностей А231/А250 должно составлять от 0,52 до 0,62.

*Испытуемый раствор.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 10 мг субстанции, растворяют в 1 мл натрия гидроксида растворе 0,1 М и доводят объём раствора хлористоводородной кислоты раствором 0,1 М до метки. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 10,0 мл полученного раствора и доводят объём раствора хлористоводородной кислоты раствором 0,1 М до метки.

*3. Качественная реакция.* Растворяют 50 мг субстанции в 5 мл натрия гидроксида раствора 0,1 М, прибавляют 1 мл реактива Несслера, нагревают до кипения и оставляют на 30 мин; должен образоваться осадок желтого цвета.

Родственные примеси. Определение проводят методом ВЭЖХ (ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография»).

Хранят и вводят растворы при температуре 8 °С.

*Подвижная фаза А (ПФА).* В мерную колбу вместимостью 1 л помещают 1,25 г калия дигидрофосфата, растворяют в воде и доводят объём раствора водой до метки.

*Подвижная фаза Б (ПФБ).* Метанол.

*Растворитель.* ПФА—ПФБ 90:10.

*Испытуемый раствор.*Около 25 мг (точная навеска) субстанции помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 5,0 мл натрия гидроксида раствора 0,1 М при обработке ультразвуком в течение не более чем 1 мин, прибавляют 80 мл растворителя, дополнительно обрабатывают ультразвуком в течение 5 мин и доводят объём раствора растворителем до метки.

*Раствор стандартного образца аллопуринола.* Около 5 мг (точная навеска) стандартного образца аллопуринола помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 2,0 мл натрия гидроксида раствора 0,1 М при обработке ультразвуком в течение не более чем 1 мин, прибавляют 80 мл растворителя, дополнительно обрабатывают ультразвуком в течение 5 мин и доводят объём раствора растворителем до метки. Раствор стабилен в течение 48 ч при хранении при температуре 8 °С.

*Раствор стандартного образца примеси A.* Около 5 мг (точная навеска) стандартного образца примеси A аллопуринола помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 2,0 мл натрия гидроксида раствора 0,1 М при обработке ультразвуком в течение не более чем 1 мин, прибавляют 80 мл растворителя, дополнительно обрабатывают ультразвуком в течение 5 мин и доводят объём раствора растворителем до метки. Раствор стабилен в течение 48 ч при хранении при температуре 8 °С.

*Раствор стандартного образца примеси B.* Около 5 мг (точная навеска) стандартного образца примеси B аллопуринола помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 2,0 мл натрия гидроксида раствора 0,1 М при обработке ультразвуком в течение не более чем 1 мин, прибавляют 80 мл растворителя, дополнительно обрабатывают ультразвуком в течение 5 мин и доводят объём раствора растворителем до метки. Раствор стабилен в течение 48 ч при хранении при температуре 8 °С.

*Раствор стандартного образца примеси C.* Около 5 мг (точная навеска) стандартного образца примеси C аллопуринола помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 2,0 мл натрия гидроксида раствора 0,1 М при обработке ультразвуком в течение не более чем 1 мин, прибавляют 80 мл растворителя, дополнительно обрабатывают ультразвуком в течение 5 мин и доводят объём раствора растворителем до метки. Раствор стабилен в течение 48 ч при хранении при температуре 8 °С.

*Раствор стандартного образца примеси D.* Около 5 мг (точная навеска) стандартного образца примеси D аллопуринола помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 2,0 мл натрия гидроксида раствора 0,1 М при обработке ультразвуком в течение не более чем 1 мин, прибавляют 80 мл растворителя, дополнительно обрабатывают ультразвуком в течение 5 мин и доводят объём раствора растворителем до метки. Раствор стабилен в течение 48 ч при хранении при температуре 8 °С.

*Раствор стандартного образца примеси E.* Около 5 мг (точная навеска) стандартного образца примеси E аллопуринола помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 2,0 мл натрия гидроксида раствора 0,1 М при обработке ультразвуком в течение не более чем 1 мин, прибавляют 80 мл растворителя, дополнительно обрабатывают ультразвуком в течение 5 мин и доводят объём раствора растворителем до метки. Раствор стабилен в течение 48 ч при хранении при температуре 8 °С.

*Стандартный раствор.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают по 1,0 мл раствора стандартного образца аллопуринола, раствора стандартного образца примеси A, раствора стандартного образца примеси B, раствора стандартного образца примеси C, раствора стандартного образца примеси D и раствора стандартного образца примеси E и доводят объём раствора растворителем до метки.

Примечание

Примесь А: 5-амино-1*H*-пиразол-4-карбоксамид, CAS5334-31-6;

Примесь В: 5-формамидо-1*H*-пиразол-4-карбоксамид, CAS 22407-20-1;

Примесь С: 5-(4*H*-1,2,4-триазол-4-ил)-1*H*-пиразол-4-карбоксамид, CAS 1346604-13-4;

Примесь D: этил(5-амино-1*H*-пиразол-4-карбоксилат), CAS 6994-25-8;

Примесь Е: этил(5-формамидо-1*H*-пиразол-4-карбоксилат), CAS 31055-19-3.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 250 × 4,6 мм, **силикагель октадецилсилильный для хроматографии** (С18), 5 мкм; |
| Температура колонки | 30 °С; |
| Температура образца | 8 °С; |
| Скорость потока | 1,0 мл/мин; |
| Детектор | спектрофотометрический, 230 нм; |
| Объём пробы | 40 мкл. |

*Режим хроматографирования*

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Время, мин | ПФА, % | ПФБ, % |
| 0–30 | 90→70 | 10→30 |
| 30–35 | 70 | 30 |
| 35–36 | 70→90 | 30→10 |
| 36–46 | 90 | 10 |

Хроматографируют стандартный и испытуемый растворы.

*Относительное время удерживания соединений.* Аллопуринол – 1; примесь A – около 0,62; примесь C – около 0,79; примесь B – около 0,81; примесь D – около 4,4 ;примесь E – около 4,8.

*Пригодность хроматографической системы.* На хроматограмме стандартного раствора:

– *разрешение* (*RS*) между пиками примеси C и примеси B должно быть не менее 0,8;

– *фактор асимметрии пика* (*AS*) аллопуринола должен быть не более 1,5.

Содержание каждой из примесей A, B, C, D и E в процентах (*Х*) вычисляют по формуле:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *S1* | − | площадь пика каждой из примесей A, B, C, D и E на хроматограмме испытуемого раствора; |
|  | *S0* | − | площадь пика каждой из примесей A, B, C, D и E на хроматограмме стандартного раствора; |
|  | *a1* | − | навеска субстанции, мг; |
|  | *a0* | − | навеска стандартного образца каждой из примесей A, B, C, D и E, мг; |
|  | *P* | − | содержание примеси A, B, C, D и E в стандартном образце примеси A, B, C, D и E, соответственно, %. |

Содержание каждой неидентифицированной примеси в процентах (*Х*) вычисляют по формуле:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *S1* | − | площадь пика каждой неидентифицированной примеси на хроматограмме испытуемого раствора; |
|  | *S0* | − | площадь пика аллопуринола на хроматограмме стандартного раствора; |
|  | *a1* | − | навеска субстанции, мг; |
|  | *a0* | − | навеска стандартного образца аллопуринола, мг; |
|  | *P* | − | содержание аллопуринола в стандартном образце аллопуринола, %. |

*Допустимое содержание примесей*:

– примесь А не более 0,2 %;

– примесь В не более 0,2 %;

– примесь С не более 0,2 %;

– примесь D не более 0,2 %;

– примесь E не более 0,2 %;

– примесь с относительным временем удерживания около 6,5 – не более 0,2 %;

– любая другая примесь – не более 0,1 %;

– сумма всех примесей – не более 1,0 %.

**Гидразин*.*** Гидразин, присутствующий в субстанции, реагирует с бензальдегидом, образуя бензальдегид азин. Определение полученного продукта реакции проводят методом ВЭЖХ (ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография»). Допускается использование и других реактивов для проведения реакции, например диметиламинобензальдегида или других реагентов, позволяющих повысить чувствительность методики. При этом применяемая методика должна быть валидирована.

*Растворитель.* Натрия гидроксида раствор 8,5 %—метанол 1:1.

*Подвижная фаза (ПФ).* 2-Пропанол—гексан 50:950.

*Раствор бензальдегида.* В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 2,0 г бензальдегида, растворяют в растворителе и доводят объём раствора растворителем до метки. Раствор готовят непосредственно перед использованием.

*Испытуемый раствор.* Около 0,25 г (точная навеска) субстанции, растворяют в 5 мл растворителя, прибавляют 4 мл раствора бензальдегида, перемешивают и оставляют при комнатной температуре на 2,5 ч. Прибавляют 5,0 мл гексана и встряхивают в течение 1 мин. Оставляют до разделения слоев, используют верхний (гексановый) слой.

*Стандартный раствор.* Около10 мг (точная навеска) гидразина сульфата помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в растворителе, при необходимости обрабатывая ультразвуком, и доводят объём раствора растворителем до метки. В мерную колбу вместимостью 20 мл помещают 1,0 мл полученного раствора и доводят объём раствора растворителем до метки. В мерную колбу вместимостью 20 мл помещают 1,0 мл полученного раствора и доводят объём раствора растворителем до метки. К 5,0 мл полученного раствора прибавляют 4 мл раствора бензальдегида, перемешивают и оставляют при комнатной температуре на 2,5 ч. Прибавляют 5,0 мл гексана и встряхивают в течение 1 мин. Оставляют до разделения слоев, используют верхний (гексановый) слой.

*Контрольный раствор.* К 5,0 мл растворителя прибавляют 4 мл раствора бензальдегида, перемешивают и оставляют при комнатной температуре на 2,5 ч. Прибавляют 5,0 мл гексана и встряхивают в течение 1 мин. Оставляют до разделения слоев, используют верхний (гексановый) слой.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 250 × 4,0 мм, силикагель цианосилильный для хроматографии, 5 мкм, с размером пор 10 нм; |
| Температура колонки | 30 °С; |
| Скорость потока | 1,5 мл/мин; |
| Детектор | спектрофотометрический, 310 нм; |
| Объём пробы | 20 мкл. |

Хроматографируют контрольный, стандартный и испытуемый растворы.

*Относительное время удерживания соединений.* Бензальдегид– 1 (около 2,8 мин), бензальдегид азин – около 0,8.

*Пригодность хроматографической системы.* На хроматограмме стандартного раствора:

– *разрешение* (*RS*) между пиками бензальдегид азина и бензальдегида должно быть не менее 2;

– *отношение сигнал/шум (S/N)* для пика бензальдегид азина должно быть не менее 20;

– *относительное стандартное отклонение* площади пика бензальдегид азина должно быть не более 15,0 % (6 определений).

Содержание гидразина в процентах (*Х*) вычисляют по формуле:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *S1* | − | площадь пика бензальдегид азина на хроматограмме испытуемого раствора; |
|  | *S0* | − | площадь пика бензальдегид азина на хроматограмме стандартного раствора; |
|  | *a1* | − | навеска субстанции, мг; |
|  | *a0* | − | навеска гидразина сульфата, мг; |
|  | *P* | − | содержание основного вещества в гидразина сульфате, %; |
|  | *32,05* | – | молекулярная масса гидразина; |
|  | *130,12* | – | молекулярная масса гидразина сульфата. |

*Допустимое содержание примесей*:

– гидразин – не более 0,00025 % (2,5 ppm).

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

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

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

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

**Количественное определение.** Определение проводят методом титриметрии.

Около 0,1 г (точная навеска) субстанции растворяют в 25 мл диметилсульфоксида, предварительно нейтрализованного по тимоловому синему 0,1 М раствором натрия гидроксида в смеси метанола и бензола, и титруют 0,1 М раствором натрия гидроксида в смеси метанола и бензола. Конечную точку титрования определяют потенциометрически (ОФС «Потенциометрическое титрование») или визуально по переходу окрашивания от желтого через зеленое до синего (индикатор – 2 капли тимолового синего метанольный раствор).

1 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида в смеси метанола и бензола соответствует 13,61 мг аллопуринола C5H4N4O.

**Хранение.** В защищенном от света месте.