МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |
| --- |
|  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Кладрибин** |  | **ФС.2.1.0600** |
| **Кладрибин** |  |  |
| **Cladribinum** |  | **Вводится впервые** |

|  |
| --- |
|  |

|  |
| --- |
|  |
| C10H12ClN5O3 | М.м. 285,69 |
| [4291-63-8] |  |

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

9-(2-Деокси-β-D-*эритро*-пентофуранозил)- 2-хлор-9*H*-пурин-6-амин.

Cодержит не менее 97,0 % и не более 102,0 % кладрибина C10H12ClN5O3 в пересчёте на безводное и свободное от остаточных органических растворителей вещество.

СВОЙСТВА

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

\*Проявляет полиморфизм.

**Растворимость**. Растворим в диметилсульфоксиде, мало растворим в воде и метаноле, практически нерастворим в ацетонитриле.

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 кладрибина.

Если спектры различаются, испытуемую субстанцию и стандартный образец по отдельности растворяют в минимальных объёмах метанола, выпаривают на водяной бане досуха при температуре 45 °С, высушивают при 105 °С в течение 2 ч и записывают спектры сухих остатков.

ИСПЫТАНИЯ

**Удельное вращение**.От –21,0 до –27,0 в пересчёте на безводное вещество (1 % раствор субстанции в диметилсульфоксиде, ОФС «Оптическое вращение»).

\*\*Прозрачность раствора. Растворяют 0,15 г субстанции в 50 мл воды, обрабатывают ультразвуком до растворения. Раствор 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**. *Примеси А, B, C, D*. Определение проводят методом ВЭЖХ (ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография»).

*Подвижная фаза А (ПФА)*. Вода.

*Подвижная фаза Б (ПФБ)*. Ацетонитрил.

*Подвижная фаза В (ПФВ)*. В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 800 мл воды, прибавляют 30 мл фосфорной кислоты концентрированной и доводят объём раствора водой до метки.

*Растворитель.* Ацетонитрил—вода 10:90.

*Испытуемый раствор.* В мерную колбу вместимостью 5 мл помещают 25 мг (точная навеска) субстанции, растворяют в растворителе и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

*Раствор сравнения А.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 1,0 мл испытуемого раствора и доводят объём раствора растворителем до метки.

*Раствор сравнения Б.* В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 1,0 мл раствора сравнения А и доводят объём раствора растворителем до метки.

*Раствор для проверки разделительной способности хроматографической системы.* В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 1 мг (точная навеска) фармакопейного стандартного образца примеси C, растворяют в 10 мл раствора сравнения А и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

*Раствор для идентификации примесей.* Растворяют 3 мг (точная навеска) фармакопейного стандартного образца для идентификации пиков (содержит примеси A, B, C и D) в 2,0 мл растворителя.

*Раствор для проверки чувствительности хроматографической системы.* В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 5,0 мл раствора сравнения Б и доводят объём раствора растворителем до метки.

Примечание

Примесь А: 9-(2-деокси-β-D-*эритро*-пентофуранозил)-9*H*-пурин-2,6-диамин [4546-70-7].

Примесь B: 9-(2-деокси-β-D-*эритро*-пентофуранозил)-2-метокси-9*H*-пурин-6-амин [24757-70-8].

Примесь C: 2-хлор-7*H*-пурин-6-амин [1839-18-5].

Примесь D: 2-хлор-9-(2-деокси-α- D-*эритро*-пентофуранозил)-9*H*-пурин-6-амин [5542-92-7].

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 250 × 4,6 мм, силикагель октилсилильный, деактивированный по отношению к основаниям для хроматографии, 5 мкм; |
| Температура колонки | 25 °С; |
| Скорость потока | 0,8 мл/мин; |
| Детектор | спектрофотометрический, 252 нм; |
| Объём пробы | 20 мкл. |

*Режим хроматографирования*

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Время, мин | ПФА, % | ПФБ, % | ПФВ, % |
| 0–10 | 80 → 70 | 10 → 20 | 10 |
| 10–25 | 70 → 20 | 20 → 70 | 10 |
| 25–30 | 20 | 70 | 10 |

Хроматографируют раствор для проверки чувствительности хроматографической системы, раствор для проверки разделительной способности хроматографической системы, раствор для идентификации примесей, раствор сравнения Б и испытуемый раствор.

*Относительное время удерживания соединений.* Кладрибин – 1 (около 10 мин); примесь A – около 0,33; примесь B – около 0,44; примесь C – около 0,73; примесь D – около 0,92.

*Идентификация примесей*. Для идентификации пиков примесей A, B, C и D используют относительное время удерживания соединений, хроматограмму раствора сравнения Б и хроматограмму, прилагаемую к фармакопейному стандартному образцу для идентификации примесей A, B, C и D.

*Пригодность хроматографической системы.* На хроматограмме раствора для проверки разделительной способности хроматографической системы *разрешение (RS)* между пиками примеси С и кладрибина должно быть не менее 4,5.

*Поправочные коэффициенты.* Для расчёта содержания примесей B и C, площади пиков этих примесей умножаются на соответствующие поправочные коэффициенты: примесь B – 1,7; примесь С – 0,8.

*Допустимое содержание примесей.* На хроматограмме испытуемого раствора:

- площадь пика каждой из примесей A и C не должна более чем в три раза превышать площадь пика кладрибина на хроматограмме раствора сравнения Б (не более 0,3 %);

- площадь пика каждой из примесей B и D не должна более чем в два раза превышать площадь пика кладрибина на хроматограмме раствора сравнения Б (не более 0,2 %);

- площадь пика любой другой примеси не должна превышать площадь пика кладрибина на хроматограмме раствора сравнения Б (не более 0,1 %);

- сумма площадей пиков всех примесей не должна превышать десятикратную площадь пика кладрибина на хроматограмме раствора сравнения Б (не более 1,0 %).

Не учитывают пики, площадь которых менее площади пика кладрибина на хроматограмме раствора для проверки чувствительности хроматографической системы (менее 0,05 %).

***Примесь Е.*** Определение проводят методом ТСХ (ОФС «Тонкослойная хроматография»).

*Пластинка.* ТСХ пластинка со слоем силикагеля F254.

*Подвижная фаза (ПФ).* Аммиака раствор концентрированный 25 %—спирт 96 %—этилацетат20:40:40.

*Испытуемый раствор*. В мерную колбу вместимостью 2 мл помещают40 мг (точная навеска) субстанции, растворяют в диметилформамиде и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

*Раствор стандартного образца примеси Е.* В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают5 мг (точная навеска) фармакопейного стандартного образца примеси Е (2-деокси-D-*эритро*-пентофураноза [1831121-84-6]), растворяют в 10 мл диметилформамида и доводят объём раствора тем же растворителем до метки. В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 3,0 мл полученного раствора и доводят объём раствора диметилформамидом до метки.

*Раствор для проверки разделительной способности хроматографической системы.* В мерную колбу вместимостью 5 мл помещают10 мг (точная навеска) фармакопейного стандартного образца примеси Е, растворяют в диметилформамиде и доводят объём раствора тем же растворителем до метки. Смешивают полученный раствор и испытуемый раствор 9:1.

*Реактив для детектирования.* Растворяют 0,5 г тимола в 100 мл смеси растворителей спирт 96 %—серная кислота концентрированная 95:5.

На линию старта пластинки наносят по 5 мкл испытуемого раствора (100 мкг), раствора стандартного образца примеси Е (0,3 мкг) и раствора для проверки разделительной способности хроматографической системы. Пластинку с нанесёнными пробами высушивают в потоке тёплого воздуха до удаления следов растворителей, 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 на воздухе, затем нагревают при температуре 45 °С в течение 10 мин, опрыскивают реактивом для детектирования, выдерживают в сушильном шкафу при температуре 110 °С в течение 20 мин или до появления зон адсорбции и просматривают в УФ – свете при длине волны 254 нм.

Хроматографическая система считается пригодной, если на хроматограмме раствора для проверки разделительной способности хроматографической системы чётко видны две зоны адсорбции.

*Допустимое содержание примесей*. На хроматограмме испытуемого раствора зона адсорбции, находящаяся на уровне зоны адсорбции примеси E, по совокупности величины и интенсивности окраски не должна превышать зону адсорбции на хроматограмме раствора стандартного образца примеси Е (не более 0,3 %).

**Вода.** Не более 0,5 % (ОФС «Определение воды», метод 1). Для определения используют 0,1 г (точная навеска) субстанции.

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

\*\***Бактериальные эндотоксины.** Не более 41,67 ЕЭ на 1 мг кладрибина (ОФС «Бактериальные эндотоксины»). Для проведения испытаний готовят исходный раствор субстанции с концентрацией 0,5 мг/мл.

**Микробиологическая чистота**. В соответствии сОФС «Микробиологическая чистота».

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Определение проводят методом ВЭЖХ в условиях испытания «Родственные примеси со следующими изменениями.

*Испытуемый раствор.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 20 мг (точная навеска) субстанции, растворяют в растворителе и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

*Раствор стандартного образца кладрибина.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 20 мг (точная навеска) фармакопейного стандартного образца кладрибина, растворяют в растворителе и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

Хроматографируют раствор стандартного образца кладрибина и испытуемый раствор.

Содержание кладрибина C10H12ClN5O3 в субстанции в пересчёте на безводное и свободное от остаточных органических растворителей вещество в процентах *(Х)* вычисляют по формуле:

$$X=\frac{S\_{1}∙a\_{0}∙Р∙100∙100}{S\_{0}∙a ∙100∙(100-W)},$$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *S1* | − | площадь пика кладрибина на хроматограмме испытуемого раствора; |
|  | *S*0 | − | площадь пика кладрибина на хроматограмме раствора стандартного образца кладрибина; |
|  | *a1* | − | навеска субстанции, мг; |
|  | *a0* | − | навеска фармакопейного стандартного образца кладрибина , мг; |
|  | *W* | − | суммарное содержание воды и остаточных органических растворителей в субстанции, %.  |
|  | *P* | − | содержание основного вещества в фармакопейном стандартном образце кладрибина, %. |

ХРАНЕНИЕ

В защищённом от света месте при температуре от 2 до 8 °С.

\*Приводится для информации.

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