**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |
| --- |
|  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Метотрексат** |  | **ФС.2.1.0470** |
| **Метотрексат** |  |  |
| **Methotrexatum** |  | **Взамен ФС 42-1592-88** |

|  |
| --- |
|  |

|  |
| --- |
|  |
| C20H22N8O5 | М.м. 454,4 |
| [59-05-2] |  |

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

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

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

СВОЙСТВА

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

**Растворимость**. Практически нерастворим в воде, спирте 96 %, метиленхлориде.

\*Растворяется в разбавленных растворах минеральных кислот, щелочей и карбонатах.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ

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

*2. ВЭЖХ*. Время удерживания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора должно соответствовать времени удерживания пика метотрексата на хроматограмме раствора стандартного образца метотрексата (раздел «Количественное определение»).

ИСПЫТАНИЯ

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

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

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

***1. Энантиомерная чистота***

*Буферный раствор.* Смешивают 600 мл натрия дигидрофосфата раствора 0,05 М с 500 мл динатрия гидрофосфата раствора 0,05 М и доводят значение pH раствора натрия гидроксида раствором 8,5 % до 6,9.

*Подвижная фаза (ПФ)*. Пропанол—буферный раствор 80:920.

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

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

*Раствор для проверки разделительной способности хроматографической системы*. В мерную колбу вместимостью 20 мл помещают 4 мг фармакопейного стандартного образца метотрексата, для проверки пригодности хроматографической системы, содержащего примесь F, растворяют в ПФ и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

Примечание

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

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 150 × 3,9 мм, силикагель 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; |
| Время хроматографирования | 3-кратное от времени удерживания пика метотрексата. |

Хроматографируют раствор для проверки разделительной способности хроматографической системы, раствор сравнения и испытуемый раствор.

*Относительное время удерживания соединений*. Метотрексат – 1 (около 7,5 мин); примесь F – около 2,3.

*Идентификация примесей.* Для идентификации пика примеси F используют относительное время удерживания соединения и хроматограмму раствора для проверки разделительной способности хроматографической системы.

*Пригодность хроматографической системы*. На хроматограмме раствора для проверки разделительной способности хроматографической системы *разрешение (RS)* между пиками метотрексата и примеси F должно быть не менее 2,0. Для достижения требуемого разрешения содержание пропанола в ПФ может быть уменьшено на 6–8 %.

*Допустимое содержание примеси*. На хроматограмме испытуемого раствора:

- площадь пика примеси F не должна более чем в 3 раза превышать площадь основного пика на хроматограмме раствора сравнения (не более 3,0 %).

***2. Другие примеси***

*Буферный раствор*. Растворяют 3,4 г натрия дигидрофосфата в 900 мл воды и доводят значение рН раствора натрия гидроксида раствором 1 М до 6,0, количественно переносят полученный раствор в мерную колбу вместимостью 1000 мл и доводят объём раствора водой до метки.

*Подвижная фаза А (ПФА)*. Ацетонитрил—буферный раствор 50:950.

*Подвижная фаза Б (ПФБ)*. Ацетонитрил—буферный раствор 500:500.

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

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

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

*Раствор для проверки разделительной способности хроматографической системы*. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 5 мг субстанции, 5 мг примеси B, 5 мг фармакопейного стандартного образца примеси C, 5 мг фармакопейного стандартного образца примеси D и 5 мг фармакопейного стандартного образца примеси E, растворяют в смеси 0,5 мл аммиака раствора 10 % и 5 мл ПФА*,* и доводят объём раствора ПФА до метки.

*Раствор для проверки чувствительности хроматографической системы*. В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 3,0 мл раствора сравнения Б и доводят объём раствора ПФА до метки.

*Раствор для идентификации*. Растворяют 8 мг фармакопейного стандартного образца метотрексата для идентификации пиков, содержащего примеси H и I, в смеси 0,1 мл аммиака раствора 10 % и 1 мл ПФА*,* и доводят объём раствора ПФА до метки.

Примечание

Примесь В: (2*S*)-2-(4-{[(2,4-Диаминоптеридин-6-ил)метил]амино}бензамидо)пентандиовая кислота [54-62-6].

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

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

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

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

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

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 250 × 4,0 мм, силикагель октадецилсилильный, эндкепированный для хроматографии, 5 мкм; |
| Температура колонки | 25 °С; |
| Скорость потока | 1,5 мл/мин; |
| Детектор | спектрофотометрический, 280 нм; |
| Объём пробы | 20 мкл. |

*Режим хроматографирования*

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Время, мин | ПФА, % | ПФБ, % |
| 0–10 | 100 | 0 |
| 10–20 | 100 → 95 | 0 → 5 |
| 20–28 | 95 → 50 | 5 → 50 |
| 28–37 | 50 | 50 |

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

*Относительное время удерживания соединений*. 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.

*Идентификация примесей.* Для идентификации пиков примесей В, С, D и Е используют относительное время удерживания соединений и хроматограмму раствор для проверки разделительной способности хроматографической системы. Для идентификации пиков примесей I и H используют относительное время удерживания соединений и хроматограмму раствор для идентификации.

*Пригодность хроматографической системы.* На хроматограмме раствора для проверки чувствительности хроматографической системы *отношение сигнал/шум (S/N)* для пика метотрексата должно быть не менее 10.

На хроматограмме раствора для проверки разделительной способности хроматографической системы:

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

- *разрешение (RS)* между пиками примеси D и метотрексата должно быть не менее 1,5.

На хроматограмме раствора для идентификации *разрешение (RS)* 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 умножают 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 %);

- площадь пика каждой из примесей B и E не должна превышать 0,6 площади основного пика на хроматограмме раствора сравнения А (не более 0,3 %);

- площадь пика каждой из примесей H и I не должна превышать более чем в 2 раза площадь основного пика на хроматограмме раствора сравнения Б (не более 0,2 %);

- площадь пика любой другой примеси не должна превышать 0,5 площади основного пика на хроматограмме раствора сравнения Б (не более 0,05 %);

- сумма площадей 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 менее площади основного пика на хроматограмме раствора для проверки чувствительности хроматографической системы (менее 0,03 %).

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

**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 3Б) в зольном остатке, полученном после сжигания 1,0 г субстанции, с использованием эталонного раствора 1.

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

**Бактериальные эндотоксины.** Не более 0,2 ЕЭ на 1 мг метотрексата (ОФС «Бактериальные эндотоксины»). Для проведения испытания готовят исходный раствор субстанции с концентрацией метотрексата 10 мг/мл в натрия гидроксида раствора 0,1 М.

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

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ

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

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

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

Хроматографируют раствор стандартного образца метотрексата и испытуемый раствор.

*Пригодность хроматографической системы*. На хроматограмме раствора стандартного образца метотрексата *фактор асимметрии* *пика* (*AS*) метотрексата должен быть не более 1,5;

Содержание метотрексата C20H22N8O5 в субстанции в пересчёте на сухое вещество в процентах (*X*) вычисляют по формуле:

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

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

ХРАНЕНИЕ

В плотно закрытой упаковке в защищённом от света месте.

\*Приводится для информации.