МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |
| --- |
|  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Фолиевая кислота** |  | **ФС.2.1.0686** |
| **Фолиевая кислота** |  |  |
| **Acidum folicum** |  | **Взамен ВФС 42-2479-95** |

|  |
| --- |
|  |

|  |
| --- |
|  |
| C19H19N7O6 | М.м. 441,40 |
| [59-30-3] |  |

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

(2*S*)-2-(4-{[(2-Амино-4-оксо-1,4-дигидроптеридин-6-ил)метил]амино} бензамидо)пентандиовая кислота.

Cодержит не менее 96,0 % и не более 102,0 % фолиевой кислоты C19H19N7O6 в пересчёте на безводное и свободное от остаточных органических растворителей вещество.

СВОЙСТВА

**Описание.** От жёлтого до оранжевого цвета кристаллический порошок. \*На свету неустойчив.

**Растворимость**. Практически нерастворима в воде и cпирте 96 %.

\*Растворима в хлористоводородной кислоты горячем растворе 8,3 % и в натрия гидроксида растворе 10 %.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ

Проводят определения 1–4 или 1–3,5.

*1.**ИК-спектрометрия* (ОФС «Спектрометрия в средней инфракрасной области»). Инфракрасный спектр субстанции по положению полос поглощения должен соответствовать спектру фармакопейного стандартного образца фолиевой кислоты.

*2. ВЭЖХ*. Время удерживания пика основного вещества на хроматограмме испытуемого раствора должно соответствовать времени удерживания пика фолиевой кислоты на хроматограмме раствора стандартного образца фолиевой кислоты (испытание «Количественное определение»).

*3.**Спектрофотометрия (*ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях»*)*. Спектр поглощения 0,001 % раствора субстанции в 0,1 М растворе натрия гидроксида в области длин волн от 230 до 380 нм должен соответствовать спектру аналогичного раствора фармакопейного стандартного образца фолиевой кислоты и иметь максимумы при длинах волн 256 нм, 283 нм и 365 нм. Отношение оптических плотностей А256/А365 должно составлять от 2,80 до 3,00.

*4. Тонкослойная хроматография* (ОФС «Тонкослойная хроматография»)*.*

*Пластинка*. ТСХ пластинка со слоем силикагеля.

*Подвижная фаза (ПФ*). Аммиака раствор 25 %—пропанол—спирт 96 % 20:20:60.

*Растворитель*. Аммиака раствор 25 %—метанол 2:9.

*Испытуемый раствор*. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 50 мг субстанции, растворяют в растворителе и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

*Раствор стандартного образца фолиевой кислоты*. В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 12,5 мг фармакопейного стандартного образца фолиевой кислоты, растворяют в растворителе и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

На линию старта пластинки наносят по 2 мкл испытуемого раствора и раствора стандартного образца фолиевой кислоты. Пластинку с нанесёнными пробами сушат на воздухе в течение 5 мин, 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 в течение 15 мин и просматривают в УФ-свете при длинах волн 254 нм и 365 нм.

Основная зона адсорбции на хроматограмме испытуемого раствора по положению, интенсивности поглощения при 254 нм, интенсивности флуоресценции при 365 нм и величине должна соответствовать основной зоне адсорбции на хроматограмме раствора стандартного образца фолиевой кислоты.

*5. Качественная реакция*. Растворяют 10 мг субстанции в 5,0 мл натрия гидроксида растворе 0,1 М, прибавляют 5,0 мл хлористоводородной кислоты раствора 0,1 М и 1 мл калия перманганата раствора 0,1 %, нагревают на водяной бане при температуре 80–85 °С в течение 3 мин, охлаждают до комнатной температуры, прибавляют по каплям 0,2 мл водорода пероксида раствора разведённого и фильтруют. Фильтрат имеет голубую флуоресценцию в УФ-свете при длине волны 365 нм.

ИСПЫТАНИЯ

Удельное вращение. От +18 до +22 в пересчёте на безводное вещество (1 % раствор субстанции в натрия гидроксида растворе 0,1 М, ОФС «Оптическое вращение»).

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

Все растворы используют свежеприготовленными и защищают от света.

*Буферный раствор.* Растворяют 11,16 г калия дигидрофосфата и 5,50 г дикалия гидрофосфата в 800 мл воды и доводят значение pH фосфорной кислотой разведённой 10 % до 6,4, количественно переносят полученный раствор в мерную колбу вместимостью 1000 мл и доводят объём раствора водой до метки.

*Подвижная фаза (ПФ)*. Метанол—буферный раствор 120:880.

*Растворитель.* В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 28,6 г натрия карбоната и доводят объём раствора водой до метки.

*Испытуемый раствор.* В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 50 мг (точная навеска) субстанции, растворяют в 2,5 мл растворителя и доводят объём раствора ПФ до метки. В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 2,0 мл полученного раствора и доводят объём раствора ПФ до метки.

*Раствор стандартного образца фолиевой кислоты.* В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 50 мг (точная навеска) фармакопейного стандартного образца фолиевой кислоты, растворяют в 2,5 мл растворителя и доводят объём раствора ПФ до метки. В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 2,0 мл полученного раствора и доводят объём раствора ПФ до метки.

*Раствор стандартного образца примеси А.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 10 мг фармакопейного стандартного образца примеси А, растворяют в 1 мл растворителя и доводят объём раствора ПФ до метки. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 1,0 мл полученного раствора и доводят объём раствора ПФ до метки.

*Раствор стандартного образца примеси D.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 4 мг (точная навеска) фармакопейного стандартного образца примеси D и доводят объём раствора растворителем до метки. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 1,0 мл полученного раствора и доводят объём раствора ПФ до метки.

*Раствор стандартного образца фолиевой кислоты для идентификации примеси I.* В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 5 мг фармакопейного стандартного образца фолиевой кислоты для идентификации примеси I, растворяют в 1 мл растворителя и доводят объём раствора ПФ до метки.

*Раствор сравнения.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 1,0 мл испытуемого раствора и доводят объём раствора ПФ до метки. В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 1,0 мл полученного раствора и доводят объём раствора ПФ до метки.

*Раствор для проверки пригодности хроматографической системы.* В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 5 мг (точная навеска) фармакопейного стандартного образца фолиевой кислоты для проверки пригодности хроматографической системы, содержащего примеси С, E, GиH, растворяют в 1 мл растворителя и доводят объём раствора ПФ **до метки.**

Примечание

Примесь A (*N*-(4-аминобензоил)-L-глутаминовая кислота): (2*S*)-2-(4-аминобензамидо)пентандиовая кислота [4271-30-1].

Примесь B: 2,5,6-триаминопиримидин-4(1*H*)-он [1004-75-7].

Примесь C (изофолиевая кислота): (2*S*)-2-(4-{[(2-амино-4-оксо-1,4-дигидроптеридин-7-ил)метил]амино}бензамидо)пентандиовая кислота [47707-78-8].

Примесь D (птероевая кислота): 4-{[(2-амино-4-оксо-1,4-дигидроптеридин-6-ил)метил]амино}бензойная кислота [119-24-4].

Примесь E (6-птеринилфолиевая кислота): (2*S*)-2-(4-{бис[(2-амино-4-оксо-1,4-дигидроптеридин-6-ил)метил]амино}бензамидо)пентандиовая кислота [1391068-26-0].

Примесь F: 2-амино-7-(хлорметил)птеридин-4(1*H*)-он [1391194-56-1].

Примесь G: (2*S*)-2-{4-[(2-амино-7-метил-4-оксо-1,4-дигидроптеридин-6-ил)амино]бензамидо}пентандиовая кислота [2734707-85-6].

Примесь H: (2*S*)-2-{4-[(4*S*)-4-(4-{[(2-амино-4-оксо-1,4-дигидроптеридин-6-ил)метил]амино}бензамидо)-4-карбоксибутанамидо]бензамидо}пентандиовая кислота [2366274-27-1].

Примесь I: неизвестная структура.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 250 × 40 мм, силикагель октилсилильный для хроматографии, 5 мкм; |
| Скорость потока | 0,6 мл/мин; |
| Детектор | спектрофотометрический, 280 нм; |
| Объём пробы | 5 мкл; |
| Время хроматографирования | 3,3-кратное от времени удерживания основного пика. |

Хроматографируют раствор для проверки пригодности хроматографической системы, раствор стандартного образца примеси А, раствор стандартного образца примеси D, раствор стандартного образца фолиевой кислоты для идентификации примеси I, раствор сравнения и испытуемый раствор.

*Относительное время удерживания соединений*. Фолиевая кислота – 1 (около 8,5 мин); примесь A – около 0,5; примесь С – около 0,9; примесь Е – около 1,3; примесь D – около 1,5; примесь I – около 2,15; примесь G – около 2,4; примесь H – около 2,5.

*Идентификация примесей.* Для идентификации пиков примесей используют относительное время удерживания соединений; хроматограмму раствора стандартного образца примеси А (для идентификации примеси А); хроматограмму раствора стандартного образца примеси D (для идентификации примеси D); хроматограмму, прилагаемую к стандартному образцу фолиевой кислоты для проверки пригодности хроматографической системы и хроматограмму раствора для проверки пригодности хроматографической системы (для идентификации примесей С, E, G и H), хроматограмму, прилагаемую к стандартному образцу фолиевой кислоты для идентификации примеси I и хроматограмму раствора стандартного образца фолиевой кислоты для идентификации примеси I (для идентификации примеси I).

*Пригодность хроматографической системы*: на хроматограмме раствора для проверки пригодности хроматографической системы:

*- разрешение (Rs)* между пиками фолиевой кислоты и примеси Е должно быть не менее 2,0;

*- отношение максимум/минимум (p/v)* между высотой пика примеси С и высотой нижней точки линии перегиба между пиками примеси С и фолиевой кислотой относительно базовой линии должно быть не менее 1,5.

*- отношение максимум/минимум (p/v)* между высотой пика примеси G и высотой нижней точки линии перегиба между пиками примеси G и примеси H относительно базовой линии должно быть не менее 1,5.

*Допустимое содержание примесей.* На хроматограмме испытуемого раствора:

- площадь пика примеси A не должна превышать площади пика примеси А на хроматограмме раствора стандартного образца примеси А (не более 0,5 %);

- площадь пика примеси D не должна более чем в 2 раза превышать площади пика примеси D на хроматограмме раствора стандартного образца примеси D (не более 0,4 %);

- площадь пика каждой из примесей С, E и G не должна более чем в 3 раза превышать площади пика фолиевой кислоты на хроматограмме раствора сравнения (не более 0,3 %);

- площадь пика каждой из примесей H и I не должна более чем в 1,5 раза превышать площади пика фолиевой кислоты на хроматограмме раствора сравнения (не более 0,15 %);

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

- сумма площадей пиков всех примесей (кроме примесей А и D) не должна более чем в 12 раз превышать площади пика фолиевой кислоты на хроматограмме раствора сравнения (не более 1,2 %).

Не учитывают пики, площадь которых менее 0,5 площади пика фолиевой кислоты на хроматограмме растворасравнения (менее 0,05 %).

**Вода**. Не более 8,5 % (ОФС «Определение воды», метод 1). Для определения используют 0,15 г (точная навеска) субстанции.

**Сульфатная зола.** Не более 0,2 % (ОФС «Сульфатная зола»). Для определения используют 1 г (точная навеска) субстанции.

**Остаточные органические растворители**. В соответствии с ОФС «Остаточные органические растворители».

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

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ

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

Хроматографируют испытуемый раствор и раствор стандартного образца фолиевой кислоты.

Содержание фолиевой кислоты C19H19N7O6 в субстанции в пересчёте на безводное и свободное от остаточных органических растворителей вещество в процентах (*X*) вычисляют по формуле:

$$X=\frac{S\_{1}∙a\_{0}∙P∙2∙50∙10∙100}{S\_{0}∙a\_{1}∙50∙10∙2∙(100-W)} ,$$

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

ХРАНЕНИЕ

В герметично укупоренной упаковке, в защищённом от света месте.

\*Приводится для информации.