|  |
| --- |
|  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Флуоресцеин динатрия** |  | **ФС** |
| **Флуоресцеин**  |  |  |
| **Fluoresceinum dinatrii** |  | **Вводится впервые** |

|  |
| --- |
|  |

2-(6-Оксидо-3-оксо-3*H*-ксантен-9-ил)бензоат динатрия



|  |  |
| --- | --- |
| C20H10Na2O5 | М.м. 376,27 |

Cодержит не менее 95,0 % и не более 103,0 % флуоресцеина динатрия C20H10Na2O5 в пересчете на сухое вещество.

**Описание**. Оранжево-красный порошок.

\*Гигроскопичен.

**Растворимость**. Легко растворим в воде, растворим в спирте 96 %, практически нерастворим в гексане и метиленхлориде.

**Подлинность**

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

*2. Качественная реакция.* В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 0,1 мл раствора, полученного в разделе «Прозрачность раствора», и доводят объём раствора водой до метки. Раствор имеет желтовато-зеленую флуоресценцию, которая исчезает при прибавлении 0,1 мл хлористоводородной кислоты разведенной 7,3 % и появляется при прибавлении 0,2 мл натрия гидроксида раствора 8,5 %.

*3. Качественная реакция.* На фильтровальную бумагу помещают 0,05 мл раствора, полученного в разделе «Подлинность. 2» (до прибавления хлористоводородной кислоты разведенной 7,3 %); должно появиться желтое пятно. На влажную фильтровальную бумагу воздействуют парами брома в течение 1 мин, а затем парами аммиака; желтый цвет пятна должен измениться на тёмно-розовый.

*4. Качественная реакция.* Сжигают 0,1 г субстанции в фарфоровом тигле. Полученный остаток растворяют в 5 мл воды и фильтруют. 2 мл полученного фильтрата должны давать характерную реакцию А на натрий (ОФС «Общие реакции на подлинность»).

**Прозрачность раствора**. Раствор 1,0 г субстанции в 50 мл воды, свободной от углерода диоксида должен быть прозрачным (ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей»).

**рН.** От 7,0 до 9,0. Используют раствор, полученный в разделе «Прозрачность раствора» (ОФС «Ионометрия», метод 3).

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

*Подвижная фаза А (ПФА).* Растворяют 0,610 г калия дигидрофосфата в воде и доводят объем раствора водой до 1000 мл. Доводят рН полученного раствора фосфорной кислотой концентрированной до 2,00±0,05.

*Подвижная фаза Б (ПФБ).* Ацетонитрил.

*Растворитель*. Ацетонитрил—ПФА 30:70.

*Испытуемый раствор (А).* Около 0,1 г (точная навеска) субстанции помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в растворителе и доводят объём раствора растворителем до метки.

*Испытуемый раствор (Б).* В мерную колбу вместимостью 250 мл помещают 5,0 мл испытуемого раствора и доводят объём раствора растворителем до метки.

*Раствор сравнения.* В мерную колбу вместимостью 20 мл помещают 5,0 мл испытуемого раствора (Б) и доводят объём раствора растворителем до метки.

*Стандартный раствор.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 10,0 мг фталевой кислоты (примесь В) и 10,0 мг резорцина (примесь А), растворяют в растворителе и доводят объём раствора растворителем до метки. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 5,0 мл полученного раствора и доводят объём раствора растворителем до метки.

Примечание.

Примесь А: бензол-1,3-диол; CAS 108-46-3;

Примесь В: бензол-1,2-дикарбоновая кислота; CAS 88-99-3;

Примесь С: 2-(2,4-дигидроксибензоил)бензойная кислота; CAS 2513-33-9.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 250× 4,6 мм, силикагель октилсилильный для хроматографии,5 мкм; |
| Температура колонки | 35° С; |
| Скорость потока | 1,0 мл/мин; |
| Детектор | спектрофотометрический, 220 нм; |
| Объём пробы | 20 мкл. |

*Режим хроматографирования*

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Время, мин | ПФА, % | ПФБ, % |
| 0–20 | 85 → 20 | 15 → 80 |
| 20–29 | 20 | 80 |
| 29–30 | 20 → 85 | 80 → 15 |
| 30–35 | 85 | 15 |

Хроматографируют стандартный раствор, раствор сравнения и испытуемый раствор.

*Относительные времена удерживания соединений*. Флуоресцеин – 1 (около 15 мин); примесь А – около 0,4; примесь В – около 0,5; примесь С – около 0,9.

*Пригодность хроматографической системы*. На хроматограмме стандартного раствора *разрешение* (*RS*)между пиками примеси А и примеси В должно быть не менее 1,5.

*Поправочный коэффициент.* Для расчёта содержания площадь пика примеси С умножают на 1,6.

*Допустимое содержание примесей.* На хроматограмме испытуемого раствора:

– площади пиков каждой из примесей A и B не должны превышать площади соответствующего пика на хроматограмме стандартного раствора (не более 0,5 %);

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

– площадь пика единичной неидентифицированной примеси не должна превышать 0,2 площади основного пика на хроматограмме раствора сравнения (не более 0,10 %);

– суммарная площадь пиков всех примесей (кроме примесей А, В и С) не должна превышать площадь основного пика на хроматограмме раствора сравнения (не более 0,5 %).

Не учитывают пики, площадь которых составляет менее 0,1 площади основного пика на хроматограмме раствора сравнения (менее 0,05 %).

**Потеря в массе при высушивании.** Не более 10,0 % (ОФС «Потеря в массе при высушивании», способ 1). Для определения используют около 1,0 г (точная навеска) субстанции.

**Сульфаты.** Не более 1,0 % (ОФС «Сульфаты», метод 1). В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 5,0 мл раствора, полученного в разделе «Прозрачность раствора», прибавляют 2,5 мл хлористоводородной кислоты разведенной 7,3 %, доводят объём раствора водой до метки и фильтруют. Для определения используют 10 мл полученного фильтрата.

**Хлориды.** Не более 0,25 % (ОФС «Хлориды»). К 4 мл раствора, полученного в разделе «Прозрачность раствора», прибавляют 95 мл воды, прибавляют 1 мл азотной кислоты разбавленной 12,5 %, выдерживают 10 мин и фильтруют. Для определения используют 10 мл полученного фильтрата.

**Цинк.** Разводят 5,0 мл раствора, полученного в разделе «Прозрачность раствора», водой до 10 мл, прибавляют 2 мл хлористоводородной кислоты 25 %, фильтруют и прибавляют 0,1 мл ферроцианида калия раствора 5,3 %; сразу не должно наблюдаться помутнения раствора или выпадения осадка.

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

**\*\*Бактериальные эндотоксины**. Не более 0,7 ЕЭ на 1 мг флуоресцеина (ОФС «Бактериальные эндотоксины»).

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

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

*Раствор стандартного образца диацетилфлуоресцеина.* Около 55 мг (точная навеска) стандартного образца диацетилфлуоресцеина помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в смеси 1 мл натрия гидроксида раствора 10 % и 5 мл спирта 96 %, нагревают на водяной бане в течение 20 мин, охлаждают до комнатной температуры и доводят объём раствора водой до метки. В мерную колбу вместимостью 250 мл помещают 5,0 мл полученного раствора и доводят объём раствора растворителем до метки.

Хроматографируют раствор стандартного образца диацетилфлуоресцеина и испытуемый раствор (Б).

Содержание флуоресцеина динатрия C20H10Na2O5 в субстанции в процентах (*Х*) в пересчете на сухое вещество рассчитывают по формуле:

$$X= \frac{S\_{1}∙a\_{0}∙100·5·250∙P∙100·376,27}{S\_{0}∙a\_{1}∙50·5·250·(100-W)·416,38}=\frac{S\_{1}∙a\_{0}∙P·200∙376,27}{S\_{0}∙a\_{1}∙(100-W)∙416,38},$$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *S*1 | − | площадь пика флуоресцеина на хроматограмме испытуемого раствора; |
|  | *S*0 | − | площадь пика флуоресцеина на хроматограмме раствора стандартного образца диацетилфлуоресцеина; |
|  | *а*1 | − | навеска субстанции, мг; |
|  | *а*0 | − | навеска стандартного образца диацетилфлуоресцеина, мг; |
|  | *W* | − | потеря в массе при высушивании, %; |
|  | *P* | − | содержание диацетилфлуоресцеина в стандартном образце диацетилфлуоресцеина, %; |
|  | *416,38* | − | молекулярная масса диацетилфлуоресцеина; |
|  | *376,27* | − | молекулярная масса флуоресцеина динатрия. |

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

\*Приводится для информации.

\*\*Проводят в субстанции, предназначенной для производства лекарственных препаратов для парентерального применения.