**Гидроксиэтилкрахмал ФС**

**Гидроксиэтилкрахмал**

**Amylum hydroxyaethylicum Вводится впервые**

Частично 2-*O*-гидроксиэтилированный кукурузный или картофельный крахмал. Получают частичным кислым гидролизом крахмала и дальнейшей реакцией с этиленоксидом.



Тип гидроксиэтилкрахмала определяется двумя характеристиками: средней молекулярной массой и степенью гидроксилирования – количеством гидроксиэтильных групп на звено ангидроглюкозы.

Гидроксиэтилкрахмал также характеризуется отношением числа гидроксиэтильных групп в положении 2 глюкозы (С2) к числу гидроксиэтильных групп в положении 6 (С6): С2/С6.

Cодержит не менее 98,0 % и не более 101,5 % гидроксиэтилкрахмала в пересчёте на сухое вещество, свободное от натрия хлорида.

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

**Растворимость**. Легко растворим в воде и диметилсульфоксиде, практически нерастворим в этаноле.

**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-1 по положению полос поглощения должен соответствовать спектру стандартного образца гидроксиэтилкрахмала средней молекулярной массы. Допустимы различия в интенсивности некоторых полос.

*2.* *Качественная реакция*. К 5 мл раствора 5 % раствора субстанции в воде, свободной от углерода диоксида, прибавляют 0,1 мл йода раствора 0,05 М. Должно появиться красно-коричневое или сине-фиолетовое окрашивание.

**Удельное вращение.** От +182,0 до +192,0 в пересчёте на сухое вещество (5,0 % раствор субстанции в воде, ОФС «Поляриметрия»).

**Прозрачность раствора.** Опалесценция раствора 5,0 г субстанции в 100 мл воды не должна превышать эталон сравнения II (ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей»).

**Цветность раствора.** Раствор, полученный в испытании «Прозрачность раствора», должен выдерживать сравнение с эталоном В7 (ОФС «Степень окраски жидкостей», метод 2).

**рН.** От 4,5 до 7,0 (К 25 мл 5 % раствора субстанции прибавляют 0,2 мл насыщенного раствора калия хлорида, ОФС «Ионометрия», метод 3).

**Средняя молекулярная масса и молекулярно-массовое распределение.** Определение проводят методом эксклюзионной хроматографии (ОФС «Эксклюзионная хроматография»).

*Буферный раствор.* В мерную колбу вместимостью 1 л помещают 54,34 г натрия ацетата, 2,0 г натрия азида, растворяют в воде, прибавляют 100,0 мл ледяной уксусной кислоты и доводят объём раствора водой до метки.

*Подвижная фаза (ПФ).* В мерную колбу вместимостью 1 л помещают 100,0 мл буферного раствора и доводят объём водой до метки. Дважды фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,2 мкм.

*Испытуемый раствор.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 2,0 г высушенной субстанции, растворяют в 50 мл воды, прибавляют 10,0 мл буферного раствора и доводят объём раствора водой до метки.

*Раствор стандартного образца гидроксиэтилкрахмала (А).* Для приготовления раствора стандартного образца гидроксиэтилкрахмала (А):

- при заявленной молекулярной массе испытуемой субстанции ниже 300 000 используют стандартный образец гидроксиэтилкрахмала со средней молекулярной массой около 130 000;

- при заявленной молекулярной массе испытуемой субстанции выше 300 000 используют стандартный образец гидроксиэтилкрахмала со средней молекулярной массой около 500 000.

В мерную колбу вместимостью 20 мл помещают 0,4 г стандартного образца гидроксиэтилкрахмала средней или высокой молекулярной массы, растворяют в 10 мл воды, прибавляют 2,0 мл буферного раствора и доводят объём раствора водой до метки.

*Раствор стандартного образца гидроксиэтилкрахмала (Б).* В мерную колбу вместимостью 20 мл помещают 10,0 мл раствора стандартного образца гидроксиэтилкрахмала (А) и доводят объём раствора ПФ до метки.

*Раствор стандартного образца гидроксиэтилкрахмала (В).* В мерную колбу вместимостью 20 мл помещают 10,0 мл раствора стандартного образца гидроксиэтилкрахмала (Б) и доводят объём раствора ПФ до метки.

*Раствор стандартного образца гидроксиэтилкрахмала (Г).* В мерную колбу вместимостью 20 мл помещают 10,0 мл раствора стандартного образца гидроксиэтилкрахмала (В) и доводят объём раствора ПФ до метки.

*Хроматографические условия*

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Колонка | 300 мм × 7,5 мм, полиметакрилатный гидроксилированный полиметакрилатный гель для хроматографии;  4 последовательно соединённые колонки:   |  |  |  | | --- | --- | --- | |  | Размер частиц, мкм | Размер пор, нм | | 1 | 17 | > 100 | | 2 | 17 | 100 | | 3 | 10 | 20 | | 4 | 10 | 12,5 | |
| Температура колонки | 22°°С; |
| Скорость потока | 0,5-1,0 мл/мин; |
| Детектор | последовательно соединённые детекторы многоуглового рассеивания лазерного света и рефрактометрический, 35 °С; |
| Объём пробы | 50 мкл. |

Хроматографируют испытуемый раствор и растворы стандартного образца гидроксиэтилкрахмала (А) и (Б).

Определяют подходящий раствор стандартного образца гидроксиэтилкрахмала:

- если средневзвешенная молекулярная масса, определённая с помощью раствора стандартного образца гидроксиэтилкрахмала (Б) не отличается более чем на 3 % от средней молекулярной массы, определённой с помощью раствора стандартного образца (А), для проверки пригодности хроматографической системы используют раствор стандартного образца гидроксиэтилкрахмала (А);

- если отклонение более 3 %, хроматографируют раствор стандартного образца гидроксиэтилкрахмала (В) и определяют среднюю молекулярную массу; если средняя молекулярная масса, определённая с помощью раствора стандартного образца гидроксиэтилкрахмала (В) не отличается более чем на 3 % от средней молекулярной массы, определённой с помощью раствора стандартного образца (Б), для проверки пригодности хроматографической системы используют раствор стандартного образца гидроксиэтилкрахмала (Б);

- если отклонение более 3 %, хроматографируют раствор стандартного образца гидроксиэтилкрахмала (Г) и определяют среднюю молекулярную массу; если средняя молекулярная масса, определённая с помощью раствора стандартного образца гидроксиэтилкрахмала (Г) не отличается более чем на 3 % от средней молекулярной массы, определённой с помощью раствора стандартного образца (В), для проверки пригодности хроматографической системы используют раствор стандартного образца гидроксиэтилкрахмала (В).

*Пригодность хроматографической системы.* Средняя молекулярная масса, определённая для стандартного образца гидроксиэтилкрахмала, не должна отличаться более чем на 5 % от заявленной для него средней молекулярной массы.

При необходимости разводят испытуемый раствор до концентрации раствора стандартного образца гидроксиэтилкрахмала, использованного для определения средней молекулярной массы.

Используют подходящее интегрирующее устройство для определения средневзвешенной молекулярной массы и молекулярных масс на границах 10 % низко и высокомолекулярных фракций.

*Нормативные требования:*

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Для ГЭК с низкой**  **молекулярной массой**  **(2 000-100 000 Да)** | **Для ГЭК со средней**  **молекулярной массой**  **(100 000-300 000 Да)** | **Для ГЭК с высокой**  **молекулярной массой**  **(300 000-900 000 Да)** |
| Средневзвешенная молекулярная масса должна составлять не менее 85 %  и не более 115 % от заявленной молекулярной массы | | |
| Молекулярная масса на границе с 10 % низкомолекулярной фракции должна составлять не менее 10 % от заявленной молекулярной массы | Молекулярная масса на границе с 10 % низкомолекулярной фракции должна быть не менее 15 000 Да | |
| Молекулярная масса на границе с 10 % высокомолекулярной фракции должна составлять не более 300 % от заявленной молекулярной массы | | Молекулярная масса на границе с 10 % субстанции высокомолекулярной фракции должна составлять не более 500 % от заявленной молекулярной массы |

**Соотношение С2/С6.** Определение проводят методом ГХ (ОФС «Газовая хроматография»).

*Раствор серной кислоты.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 60 мл воды, прибавляют 5,5 мл серной кислоты концентрированной, охлаждают до комнатной температуры и доводят объём раствора водой до метки.

*Раствор А.* Раствор серной кислоты—вода 1:1.

*Испытуемый раствор.* В два флакона вместимостью 5 мл помещают по 0,18 г субстанции, прибавляют 3,0 мл раствора А, укупоривают флакон и встряхивают до растворения. Выдерживают флакон в течение 4 часов при температуре 100 °С, периодически встряхивая. Охлаждают до комнатной температуры. К полученному раствору осторожно прибавляют 0,9 г бария карбоната, встряхивают и затем центрифугируют при около 10 000 об/мин в течение 15 минут. Проверяют раствор на нейтральность рН с помощью индикаторной бумаги. Если раствор сохраняет кислую среду, прибавляют бария карбоната порциями по 0,2 г до достижения нейтральной реакции среды. Раствор фильтруют. Во флакон помещают 0,5 мл фильтрата и выпаривают досуха при температуре 40 °С. Остаток растворяют в смеси 0,50 мл пиридина, 0,25 мл *N, О*-бис(триметилсилил)ацетамида и 25 мкл хлортриметилсилана. Флакон укупоривают и выдерживают в течение 1 часа при 40°С, периодически встряхивая. Охлаждают до комнатной температуры.

*Раствор стандартного образца гидроксиэтилкрахмала средней молекулярной массы.* Обрабатывают 0,18 г стандартного образца гидроксиэтилкрахмала средней молекулярной массы как описано для испытуемой субстанции.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | кварцевая капиллярная 15 м × 0,32 мм, покрытая слоем поли(диметил)силоксана, 0,25 мкм; |
| Детектор | пламенно-ионизационный; |
| Газ-носитель | водород для хроматографии; |
| Деление потока | 1:20; |
| Давление газа-носителя | 69 кПа; |
| Режим хроматографирования | постоянное давление; |
| Объём пробы | 1 мкл; |
| |  |  |  |  | | --- | --- | --- | --- | | Температура | колонка | 0-1 мин | 150°С | |  |  | 1-25мин | 150→270 °С | |  |  | 25-28 мин | 270°С | |  | инжектор | 250 °С; | | |  | детектор | 300°С; | | | |

Хроматографируют испытуемый раствор и раствор стандартного образца гидроксиэтилкрахмала средней молекулярной массы.

*Идентификация пиков*. Для идентификации пиков используется хроматограмма, прилагаемая к стандартному образцу гидроксиэтилкрахмала и хроматограмма раствора стандартного образца гидроксиэтилкрахмала средней молекулярной массы.

*Пригодность хроматографической системы.* На хроматограмме раствора стандартного образца гидроксиэтилкрахмала средней молекулярной массы:

- *разрешение (Rs)* между пиками 2-*O*-гидроксиэтил-ß-D-глюкозы и 6-*O*-гидроксиэтил-ß-D-глюкозы должно быть не менее 1,5;

- *фактор асимметрии* *пика* (*AS*) дериватизированного продукта 1 должен быть не более 1,5;

- *относительное стандартное отклонение* площади пика дериватизированного продукта 1 должно быть не более 5,0 (для трёх инжекций).

Соотношение С2 /С6 вычисляют по формуле:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *S*1 | − | площадь пика дериватизированного продукта 1 на хроматограмме испытуемого раствора; |
|  | *S*2 | − | площадь пика дериватизированного продукта 2 на хроматограмме испытуемого раствора; |
|  |  | − | площадь пика дериватизированного продукта 3 на хроматограмме испытуемого раствора |
|  | *S4* | − | площадь пика 2-O-гидроксиэтил-α-D-глюкозы на хроматограмме испытуемого раствора; |
|  | *S5* | − | площадь пика 2-O-гидроксиэтил-ß-D-глюкозы на хроматограмме испытуемого раствора; |
|  | *S6* | − | площадь пика 6-O-гидроксиэтил-α-D-глюкозы на хроматограмме испытуемого раствора; |
|  | *S7* | − | площадь пика 6-O-гидроксиэтил-ß-D-глюкозы на хроматограмме испытуемого раствора. |

Рассчитывают среднее значение соотношения С2/С6 по величинам, полученным по 2 испытуемым растворам.

Результаты анализа считаются достоверными, если различие значений между двумя испытуемыми растворами не превышает 5 %.

Допустимое содержание – от 80  % до 120 % от заявленного значения.

**Степень молярного замещения.** От 0,05 до 2,4 и от 92 % до 108% от заявленного значения. Определение проводят методом ГХ (ОФС «Газовая хроматография»).

Определение параметра степени молярного замещения проводят после химической реакции гидроксиэтилкрахмала с раствором йодистоводородной кислоты в присутствии адипиновой кислоты в качестве катализатора. В результате реакции все гидроксиэтильные группы гидролизуются под действием йодистоводородной кислоты до йодэтана. Образовавшийся в результат легколетучий йодэтан улавливается ксилольной фазой, которая в дальнейшем отбирается и подвергается газохроматографическому анализу.

*Раствор внутреннего стандарта*. В мерную колбу вместимостью 200 мл помещают 1,0 мл толуола и доводят объём раствора ксилолом до метки.

*Испытуемый раствор.* В пять флаконов вместимостью 20 мл помещают по 50 мг субстанции и 0,1-0,15 г адипиновой кислоты. Прибавляют по 1,0 мл раствора внутреннего стандарта и по 2,0 мл йодистоводородной кислоты. Герметично закрывают флаконы алюминиевыми колпачками с уплотнителями.

*Стандартные растворы.* В каждый из 7 флаконов вместимостью 20 мл помещают 0,1-0,15 г адипиновой кислоты. Прибавляют 1,0 мл раствора внутреннего стандарта и 2,0 мл йодистоводородной кислоты. Герметично закрывают флаконы алюминиевыми колпачками с уплотнителями.

Взвешивают флаконы с точностью до 10 мкг. Прибавляют соответственно около 10 мг, 20 мг, 30 мг, 40 мг, 50 мг, 60 мг, 70 мг йодэтана с помощью шприца вместимостью 0,1 мл, аккуратно прокалывая уплотнитель. Снова взвешивают флакон с точностью до 10 мкг и рассчитывают количество внесённого йодэтана.

Помещают флаконы в предварительно прогретый термоблок и выдерживают в течение 10 часов при температуре 150 °С. Затем охлаждают до комнатной температуры и определяют вес флаконов с точностью до 1 мг. Не принимают во внимание флаконы с потерей массы более 5 мг. Из 4 флаконов с испытуемым раствором и 4-5 флаконов со стандартными растворами отбирают по 100 мкл верхнего слоя, переносят во флаконы автосэмплера и прибавляют по 1,0 мл ксилола. Немедленно укупоривают и встряхивают.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | кварцевая капиллярная 30 м × 0,53 мм,  покрытая слоем поли[(цианопропил)(фенил)][диметил]силоксана, 3 мкм; |
| Детектор | пламенно-ионизационный; |
| Газ-носитель | гелий для хроматографии; |
| Деление потока | 1:20**;** |
| Скорость потока | 8 мл/мин; |
| Объём пробы | 1 мкл; |
| |  |  |  |  | | --- | --- | --- | --- | | Температура | колонка | 0-4 мин | 50°С | |  |  | 4-16 мин | 50→230 °С | |  |  | 16-20 мин | 230°С | |  | инжектор | 200 °С; | | |  | детектор | 280°С. | | | |

Хроматографируют испытуемый раствор и стандартные растворы.

*Пригодность хроматографической системы.* На хроматограмме стандартных растворов:

- *разрешение (R)* между пиками йодэтана и толуола должно быть не менее 1,5.

Для каждой хроматограммы стандартных растворов рассчитывают отношение площади пика йодэтана к площади пика внутреннего стандарта (). Строят зависимость полученных отношений от количества (мг) внесённого йодэтана. Рассчитывают параметры линейной регрессии. *Коэффициент корреляции (r)* должен составлять не менее 0,990.

Содержание *йодэтана* в испытуемом растворе в мг (Х1) определяют по калибровочному графику.

Содержание этиленоксида в % (*Х*2) рассчитывают по формуле :

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *44,05* | − | молекулярная масса этиленоксида; |
|  | *155,97* | − | молекулярная масса йодэтана; |
|  |  | − | навеска испытуемой субстанции, мг. |

Степень молярного замещения (Х3) рассчитывают по формуле:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *44,05* | − | молекулярная масса этиленоксида; |
|  | *162,14* | − | молекулярная масса ангидроглюкозы. |

Определяют среднее значение степени молярного замещения из результатов, полученных для 4 испытуемых растворов.

**Этиленгликоль.** Не более 0,004 %. Определение проводят методом ВЭЖХ (ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография»).

*Подвижная фаза (ПФ)*. Вода.

*Испытуемый раствор.* В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 1,0 г (точная навеска) высушенной субстанции и доводят объём раствора водой до метки.

*Стандартный раствор.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 0,80 г этиленгликоля, растворяют в воде и доводят объём раствора водой до метки. В мерную колбу вместимостью 200 мл помещают 2,0 мл полученного раствора и доводят объём раствора водой до метки. В мерную колбу вместимостью 200 мл помещают 2,0 мл полученного раствора и доводят объём раствора водой до метки.

*Постколоночный раствор.* В мерную колбу вместимостью 1 л помещают 750 мл натрия гидроксида раствора 2 М и доводят объём раствора водой до метки.

*Промывной раствор.* Вода—ацетонитрил 80:20.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Предколонка | 10 × 4 мм силикагель октадецилсилильный для хроматографии (С18), 5 мкм; |
| Колонка | 250 × 4,6 мм, силикагель октадецилсилильный для хроматографии (С18), 5 мкм; |
| Температура колонки | 30 °С; |
| Скорость потока | 1 мл/мин; |
| Скорость потока постколоночного раствора | 0,2 мл/мин; |
| Детектор | импульсно-амперометрический; |
| Объём пробы | 20 мкл. |

*Режим хроматографирования*

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Время, мин | ПФ, % | Промывной раствор % |
| 0–15 | 75 | 25 |
| 15–20 | 75→0 | 25→100 |
| 20–25 | 0 | 100 |
| 25–30 | 0→100 | 100→0 |
| 30–100 | 100 | 0 |
| 100 – 105 | 100 → 75 | 0 → 25 |

Хроматографируют испытуемый раствор и стандартный раствор.

Время удерживанияэтиленгликоля составляет около 4,0 минут.

*Пригодность хроматографической системы.* На хроматограмме стандартного раствора:

– *отношение сигнал/шум (S/N)* для пика этиленгликоля должно быть не менее 10,0 ;

– *относительное стандартное отклонение* площади пика этиленгликоля должно быть не более 10 % (6 определений).

*Допустимое содержание этиленгликоля.* На хроматограмме испытуемого раствора площадь пика этиленгликоля не должна превышать площадь основного пика на хроматограмме стандартного раствора.

**Натрия хлорид.** Не более 0,1 %. Определение проводят методом титриметрии.

*Испытуемый раствор.* В коническую колбу вместимостью 250 мл помещают 10,0 г субстанции, растворяют в 100 мл воды, прибавляют 2 мл азотной кислоты разведенной 12,5 % и 5,0 мл натрия хлорида раствора 0,9 %.

*Раствор сравнения.* В коническую колбу вместимостью 250 мл помещают 5,0 мл натрия хлорида раствора 0,9 % и 100 мл воды. Прибавляют 2 мл азотной кислоты разбавленной 12,5 %.

Титруют 0,1 М раствором серебра нитрата. Конечную точку титрования определяют потенциометрически (ОФС «Потенциометрическое титрование»).

Содержание натрия хлорида в процентах *(Х)* рассчитывают по формуле:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где |  | − | объём раствора серебра нитрата 0,1 М, израсходованный на титрование испытуемого раствора, мл; |
|  |  | − | объём раствора серебра нитрата 0,1 М, израсходованный на титрование раствора сравнения, мл; |
|  | *a* | − | навеска испытуемой субстанции, мг. |

**Потеря в массе при высушивании**. Не более 15,0 % (ОФС «Потеря в массе при высушивании», способ 1). Для определения используют около 1,0 г субстанции

**Тяжёлые металлы**. Не более 0,001 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Тяжёлые металлы», метод 2, в зольном остатке, полученном после сжигания 1,0 г субстанции с использованием стандартного раствора 1.

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

**Аномальная токсичность.** Субстанция должна быть нетоксичной (ОФС «Аномальная токсичность»). Тест-доза – 50 мг гидроксиэтилкрахмала в 0,5 мл 0,9 % раствора натрия хлорида на мышь. Срок наблюдения 48 ч.

**Бактериальные эндотоксины**. Не более 2,5 ЕЭ на 1 г гидроксиэтилкрахмала (ОФС «Бактериальные эндотоксины»).

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

**Количественное определение.** Определение проводят методом поляриметрии (ОФС «Поляриметрия»).

*Испытуемый раствор.* В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают около 2,5 г (точная навеска) субстанции, растворяют в воде и доводят объём раствора этим же растворителем до метки. Полученный раствор помещают в кювету прибора и определяют угол оптического вращения при длине волны 589,3 нм, температуре 20 °С и длине кюветы 2 дм.

**Хранение**. В защищённом от света месте.

\*Приводится для информации.