М**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |
| --- |
|  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Тетрациклин** |  | **ФС.2.1.0590** |
| **Тетрациклин** |  |  |
| **Tetracyclinum** |  | **Взамен ФС 42-2672-97** |

|  |
| --- |
|  |

|  |
| --- |
|  |
| C22H24N2O8 | М.м. 444,44 |
| [60-54-8] |  |

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

(4*S*,4a*S*,5a*S*,6*S*,12a*S*)-3,6,10,12,12a-Пентагидрокси-4-(диметиламино)-6-метил-1,11-диоксо-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-октагидротетрацен-2-карбоксамид.

Cодержит не менее 88,0 % и не более 102,0 % тетрациклина C22H24N2O8 в пересчёте на сухое вещество.

\*Субстанция образуется определёнными штаммами Streptomyces aerofaciens или получается другими способами.

СВОЙСТВА

**Описание.** Жёлтый кристаллический порошок.

\*Гигроскопичен. При хранении на свету темнеет.

**Растворимость.** Растворим в спирте 96 % и метаноле, очень мало растворим в воде.

\*Растворяется в разбавленных растворах кислот и щелочей.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ

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

*Пластинка.* ТСХ пластинка со слоем силикагеля октадецилсилильного F254.

*Подвижная фаза (ПФ*). Ацетонитрил—метанол—щавелевой кислоты раствор 6,3 %, доведённый до рН 2 аммиака раствором концентрированным 25 % 20:20:60.

*Испытуемый раствор*. В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 5,0 мг (точная навеска) субстанции, растворяют в метаноле и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

*Раствор стандартного образца тетрациклина гидрохлорида.* В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 5,0 мг фармакопейного стандартного образца тетрациклина гидрохлорида, растворяют в метаноле и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

*Раствор для проверки разделительной способности хроматографической системы*. В мерную колбувместимостью 10 мл помещают 5,0 мг фармакопейного стандартного образца тетрациклина гидрохлорида, 5 мг демеклоциклина гидрохлорида и 5 мг окситетрациклина гидрохлорида, растворяют в метаноле и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

На линию старта пластинки наносят по 1 мкл испытуемого раствора, раствора стандартного образца тетрациклина гидрохлорида и раствора для проверки разделительной способности хроматографической системы. Пластинку с нанесёнными пробами сушат на воздухе, 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 до удаления следов растворителей и просматривают в УФ-свете при длине волны 254 нм.

*Пригодность хроматографической системы.* На хроматограмме раствора для проверки разделительной способности хроматографической системы должны обнаруживаться три чётко разделённые зоны адсорбции.

*Результат.* Основная зона адсорбции на хроматограмме испытуемого раствора по положению, интенсивности поглощения и величине должна соответствовать зоне адсорбции на хроматограмме раствора стандартного образца тетрациклина гидрохлорида.

*2. Качественная реакция*. Растворяют 2 мг субстанции в 5 мл серной кислоты концентрированной; должно появиться фиолетово-красное окрашивание. После прибавления 2,5 мл воды окраска должна измениться на жёлтую.

*3. Качественная реакция*. Растворяют 10,0 мг субстанции в смеси 1,0 мл азотной кислоты разведённой 12,5 % и 5,0 мл воды. Встряхивают и прибавляют 1,0 мл серебра нитрата раствора 1,7 %. Опалесценция полученного раствора не должна превышать опалесценцию смеси 1,0 мл азотной кислоты разведённой 12,5 %, 5,0 мл воды и 1 мл серебра нитрата раствора 1,7 %.

ИСПЫТАНИЯ

**Удельное вращение** от –260 до –280 в пересчёте на сухое вещество (0,5 % раствор субстанции в 0,1 М растворе хлористоводородной кислоты, ОФС «Оптическое вращение»).

**Оптическая плотность.** Оптическая плотность испытуемого раствора, измеренная при длине волны 430 нм в кювете с толщиной слоя 1 см (относительно раствора сравнения), в течение 1 ч после приготовления раствора, не должна превышать 0,5 (ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях»).

*Испытуемый раствор.* В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 20 мг (точная навеска) субстанции, растворяют в хлористоводородной кислоты растворе 0,01 М и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

*Раствор сравнения.* Хлористоводородной кислоты раствор 0,01 М.

**pH раствора.** От 3,0 до 7,0 (1 % суспензия, ОФС «Ионометрия», метод 3).

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

Растворы готовят непосредственно перед использованием.

*Раствор дикалия гидрофосфата.* В химический стакан вместимостью 1000 мл помещают 35 г дикалия гидрофосфата, растворяют воде, доводят значение рН фосфорной кислотой разведённой 10 % до 9,00, переносят раствор в мерную колбу вместимостью 1000 мл и доводят объём раствора водой до метки.

*Раствор тетрабутиламмония гидросульфата.* В химический стакан вместимостью 1000 мл помещают 10 г тетрабутиламмония гидросульфата, растворяют в воде, доводят значение рН натрия гидроксида раствором 8,5 % до 9,00, переносят раствор в мерную колбу вместимостью 1000 мл и доводят объём раствора водой до метки.

*Раствор динатрия эдетата.* В химический стакан вместимостью 1000 мл помещают 40 г динатрия эдетата дигидрата, растворяют в воде, доводят значение рН натрия гидроксида раствором 8,5 % до 9,00, переносят раствор в мерную колбу вместимостью 1000 мл и доводят объём раствора водой до метки.

*Подвижная фаза (ПФ).* В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают раствор 80,0 г *трет*-бутилового спирта в 200 мл воды, прибавляют 100 мл раствора дикалия гидрофосфата, 200 мл раствор тетрабутиламмония гидросульфата, 10 мл раствора динатрия эдетата и доводят объём раствора водой до метки.

*Испытуемый раствор*. В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 25,0 мг (точная навеска) субстанции, растворяют в хлористоводородной кислоты растворе 0,01 М и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

*Раствор стандартного образца тетрациклина гидрохлорида.* В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 25 мг (точная навеска) фармакопейного стандартного образца тетрациклина гидрохлорида, растворяют в хлористоводородной кислоты растворе 0,01 М и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

*Раствор* *стандартного образца примеси A*. В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 15 мг (точная навеска) фармакопейного стандартного образца примеси A, растворяют в хлористоводородной кислоты растворе 0,01 М и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

*Раствор стандартного образца примеси C*. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 10 мг (точная навеска) фармакопейного стандартного образца примеси C, растворяют в хлористоводородной кислоты растворе 0,01 М и доводят объём раствора тем же растворителем до метки**.**

*Раствор стандартного образца примеси D*. В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 10 мг (точная навеска) фармакопейного стандартного образца примеси D, растворяют в хлористоводородной кислоты растворе 0,01 М и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

*Раствор сравнения.* В мерную колбу вместимостью 200 мл помещают 20,0 мл растворастандартного образца примеси A, 10,0 мл раствора стандартного образца примеси C, 5,0 мл раствора стандартного образца примеси D и доводят объём раствора хлористоводородной кислоты раствором 0,01 М до метки.

*Раствор для проверки пригодности хроматографической системы*. В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 1,0 мл раствора стандартного образца тетрациклина гидрохлорида, 2,0 мл раствора стандартного образца примеси A, 5,0 мл раствора стандартного образца примеси D и доводят объём раствора хлористоводородной кислоты раствором 0,01 М до метки.

*Раствор для проверки чувствительности хроматографической системы*. В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 1,0 мл раствора стандартного образца примеси C и доводят объём раствора хлористоводородной кислоты раствором 0,01 М до метки.

Примечание

Примесь А (4-эпитетрациклин): (4*R*,4a*S*,5a*S*,6*S*,12a*S*)-3,6,10,12,12a-пентагидрокси-4-(диметиламино)-6-метил-1,11-диоксо-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-октагидротетрацен-2-карбоксамид [79-85-6].

Примесь B: (4*S*,4a*S*,5a*S*,6*S*,12a*S*)-2-Ацетил-3,6,10,12,12a-пентагидрокси-4-(диметиламино)-6-метил-4a,5a,6,12a-тетрагидротетрацен-1,11(4*H*,5*H*)-дион [6542-44-5].

Примесь С (ангидротетрациклин): (4*S*,4a*S*,12a*S*)-3,10,11,12a-тетрагидрокси-4-(диметиламино)-6-метил-1,12-диоксо-1,4,4a,5,12,12a-гексагидротетрацен-2-карбоксамид [1665-56-1].

Примесь D (4-эпиангидротетрациклин): (4*R*,4a*S*,12a*S*)-3,10,11,12a-тетрагидрокси-4-(диметиламино)-6-метил-1,12-диоксо-1,4,4a,5,12,12a-гексагидротетрацен-2-карбоксамид [7518-17-4].

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 25,0 × 4,6 см, сополимер стирол-дивинилбензола, 8 мкм; |
| Температура колонки | 60°С; |
| Скорость потока | 1,0 мл/мин; |
| Детектор | спектрофотометрический, 254 нм; |
| Объём пробы | 20 мкл; |

Хроматографируют раствор для проверки чувствительности хроматографической системы, раствор для проверки пригодности хроматографической системы, раствор сравнения и испытуемый раствор.

*Идентификация примесей.* Для идентификации пиков примесей используются хроматограммы растворов для проверки пригодностии чувствительности хроматографической системы.

*Пригодность хроматографической системы*. На хроматограмме раствора для проверки пригодности хроматографической системы:

- *разрешение (RS)* между пиками примеси A (пик 1) и тетрациклина (пик 2) должно быть не менее 2,5;

- *разрешение (RS)* между пиками тетрациклина (пик 2) и примеси D (пик 3) должно быть не менее 8,0;

- *фактор асимметрии* *пика* (*AS*) тетрациклина должен быть не более 1,25;

- на хроматограмме раствора для проверки пригодности хроматографической системы *отношение сигнал/шум (S/N)* для основного пика должно быть не менее 3.

*Допустимое содержание примесей.* На хроматограмме испытуемого раствора:

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

- площадь пика примеси B (выходит на хвосте основного пика) не должна превышать 0,4 площади пика примеси A на хроматограмме раствора сравнения (не более 2,0 %);

- площадь пика примеси C не должна превышать площадь основного пика на хроматограмме раствора сравнения (не более 1,0 %);

- площадь пика примеси D не должна превышать площадь основного пика на хроматограмме раствора сравнения (не более 0,5 %).

**Потеря в массе при высушивании**

Не более 13,0 % (ОФС «Потеря в массе при высушивании», способ 1). Для определения используют 1 г (точная навеска) субстанции.

**Сульфатная зола.** Не более 0,5 % (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 3А), в зольном остатке, полученном после сжигания 1 г субстанции, с использованием эталонного раствора 1.

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

\*\***Аномальная токсичность**. Субстанция должна быть нетоксичной (ОФС «Аномальная токсичность»). Тест-доза – 1 мг тетрациклина в 0,5 мл воды для инъекций на мышь. Срок наблюдения 48 ч.

\*\***Бактериальные эндотоксины.** Не более 0,5 ЕЭ/мг тетрациклина (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.

Хроматографируют испытуемый раствор и раствор стандартного образца тетрациклина гидрохлорида.

Содержание тетрациклина C22H24N2O8 в субстанции в процентах (*X*) в пересчёте на сухое вещество вычисляют по формуле:

$$X=\frac{S\_{1}∙a\_{0}∙25∙P∙0,9241∙100}{S\_{0}∙a\_{1}∙25∙(100-W)},$$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *S1* | – | площадь пика тетрациклина на хроматограмме испытуемого раствора; |
|  | *S*0 | – | площадь пика тетрациклина на хроматограмме стандартного раствора А; |
|  | *а*1 | – | навеска субстанции, мг; |
|  | *а*0 | – | навеска фармакопейного стандартного образца тетрациклина гидрохлорида, мг; |
|  | *W* | – | потеря в массе при высушивании, %; |
|  | *P* | – | содержание тетрациклина гидрохлорида в фармакопейном стандартном образце тетрациклина гидрохлорида, %. |
|  | 0,9241 | – | коэффициент пересчёта тетрациклина гидрохлорида в тетрациклин. |

ХРАНЕНИЕ

В укупоренной упаковке, в защищённом от света месте.

\*Приводится для информации.

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