**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |
| --- |
|  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Гидрокортизон** |  | **ФС.2.1.0672** |
| **Гидрокортизон** |  |  |
| **Hydrocortisonum** |  | **Вводится впервые** |

|  |
| --- |
|  |

|  |
| --- |
|  |
| C21H30O5 | М.м. 362,46 |
| [50-23-7] |  |

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

11β,17,21-Тригидроксипрегн-4-ен-3,20-дион.

Cодержит не менее 97,0 % и не более 103,0 % гидрокортизона C21H30O5 в пересчёте на сухое вещество.

СВОЙСТВА

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

\*Проявляет полиморфизм.

**Растворимость**. Умеренно растворим в ацетоне и спирте 96 %, мало растворим в метиленхлориде, очень мало растворим или практически нерастворим в воде.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ

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

Если спектры различаются, испытуемую субстанцию и стандартный образец по отдельности растворяют в минимальных объёмах ацетона, выпаривают досуха на водяной бане и незамедлительно записывают спектры сухих остатков.

*2. ВЭЖХ*. Время удерживания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора должно соответствовать времени удерживания пика гидрокортизона на хроматограмме раствора стандартного образца гидрокортизона (раздел «Родственные примеси»).

*3.*Определение проводят методом ТСХ (ОФС «Тонкослойная хроматография»)

*Пластинка.* ТСХ пластинка со слоем силикагеля F254.

*Подвижная фаза А (ПФА).* Вода—метанол—эфир—метиленхлорид 1,2:8:15:77.

*Подвижная фаза Б (ПФБ).* Бутанол, насыщенный водой—толуол—эфир 5:15:80.

*Испытуемый раствор*. В мерную колбу вместимостью 5 мл помещают 25 мг субстанции, растворяют в метаноле и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

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

*Раствор стандартного образца А.* В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 2 мл раствора стандартного образца гидрокортизона и доводят объём раствора метиленхлоридом до метки.

*Раствор стандартного образца Б.* В стеклянную пробирку длиной 100 мм и диаметром 20 мм с подходящей стеклянной притёртой пробкой или пробкой из политетрафторэтилена помещают 0,4 мл раствора стандартного образца гидрокортизона и выпаривают растворитель при слабом нагревании в потоке азота. Прибавляют 2 мл уксусной кислоты разведённой 15 % и 50 мг натрия висмутата, пробирку закрывают и встряхивают полученную суспензию в течение 1 ч на механическом встряхивателе, защищая раствор от света. Прибавляют 2 мл уксусной кислоты разведённой 15 % и фильтруют в делительную воронку вместимостью 50 мл, промывая фильтр двумя порциями воды по 5 мл каждая. Прозрачный фильтрат встряхивают с 10 мл метиленхлорида. Органический слой промывают 5 мл натрия гидроксида раствором 1 М и двумя порциями воды по 5 мл каждая и высушивают с использованием натрия сульфата безводного.

*Раствор сравнения А.* В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 2 мл испытуемого раствора и доводят объём раствора метиленхлоридом до метки.

*Раствор сравнения Б.* В стеклянную пробирку длиной 100 мм и диаметром 20 мм с подходящей стеклянной притёртой пробкой или пробкой из политетрафторэтилена помещают 0,4 мл испытуемого раствора и выпаривают растворитель при слабом нагревании в потоке азота. Прибавляют 2 мл уксусной кислоты разведённой 15 % и 50 мг натрия висмутата, пробирку закрывают и встряхивают полученную суспензию в течение 1 ч на механическом встряхивателе, защищая раствор от света. Прибавляют 2 мл уксусной кислоты разведённой 15 % и фильтруют в делительную воронку вместимостью 50 мл, промывая фильтр двумя порциями воды по 5 мл каждая. Прозрачный фильтрат встряхивают с 10 мл метиленхлорида. Органический слой промывают 5 мл натрия гидроксида раствором 1 М и двумя порциями воды по 5 мл каждая и высушивают с использованием натрия сульфата безводного.

*Реактив для детектирования.* Серной кислоты раствор спиртовой 36,6 %.

На линию старта пластинки наносят 5 мкл раствора сравнения А, 5 мкл раствора стандартного образца А, 25 мкл раствора сравнения Б, 25 мкл раствора стандартного образца Б. Последние два раствора наносятся малыми количествами для получения пятен небольшого размера. Пластинку с нанесёнными пробами сушат на воздухе, помещают в камеру с ПФА и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт ПФА пройдёт около 15 см длины пластинки от линии старта, её вынимают из камеры с ПФА и помещают в камеру с ПФБ, хроматографируют восходящим способом. Когда фронт ПФБ пройдёт около 15 см длины пластинки от линии старта, её вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей.

Просматривают в УФ-свете при длине волны 254 нм.

Основные зоны адсорбции на хроматограмме растворов сравнения А и Б по положению и величине должны соответствовать зонам адсорбции гидрокортизона на хроматограмме растворов стандартных образцов А и Б.

Пластинку опрыскивают реактивом для детектирования, выдерживают в сушильном шкафу при температуре 120 °С в течение 10 мин или до появления пятен. Охлаждают и просматривают при видимом свете и в
УФ-свете при длине волны 365 нм.

Основные зоны адсорбции на хроматограмме растворов сравнения А и Б по положению, величине и окраске при видимом свете и положению, величине и интенсивности флуоресценции в УФ-свете должны соответствовать зонам адсорбции гидрокортизона на хроматограмме растворов стандартных образцов А и Б.

*Пригодность хроматографической системы.* Значения Rf основных зон адсорбции на хроматограмме растворов сравнения Б и стандартного образца Б заметно выше значений Rf основных зон адсорбции на хроматограмме растворов сравнения А и стандартного образца А.

*4.* *Качественная реакция*. К 2 мг субстанции прибавляют 2 мл серной кислоты концентрированной и встряхивают до растворения; в течение 5 мин должно появиться интенсивное коричнево-красное окрашивание с зелёной флуоресценцией, более интенсивной при просмотре в УФ-свете при длине волны 365 нм. Полученный раствор прибавляют к 10 мл воды и перемешивают; окраска должна измениться на более тусклую, прозрачность раствора и зелёная флуоресценция в УФ-свете сохраняются.

ИСПЫТАНИЯ

**Удельное вращение.** От +162 до +168 в пересчёте на сухое вещество (ОФС «Оптическое вращение»).

*Испытуемый раствор.* В мерную колбу вместимостью 25 млпомещают 0,2 г субстанции, растворяют в метаноле, доводят объём раствора тем же растворителем до метки и обрабатывают ультразвуком в течение 10 мин.

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

*Подвижная фаза А (ПФА).* Вода.

*Подвижная фаза Б (ПФБ).* Ацетонитрил.

*Растворитель*. Ацетонитрил—вода 400:600.

*Испытуемый раствор.* В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 20 мг (точная навеска) субстанции, растворяют в растворителе, доводят объём раствора растворителем до метки и обрабатывают раствор ультразвуком в течение 10 мин.

*Раствор стандартного образца гидрокортизона.* Растворяют 2 мг (точная навеска) фармакопейного стандартного образца гидрокортизона в 1,0 мл растворителя и обрабатывают раствор ультразвуком в течение 10 мин.

*Раствор стандартного образца гидрокортизона, содержащего примеси D, E, G, H, I и N.* Растворяют 2 мг (точная навеска) фармакопейного стандартного образца гидрокортизона содержащего примеси D, E, G, H, I и N в 1,0 мл растворителя и обрабатывают раствор ультразвуком в течение 10 мин.

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

*Раствор для идентификации.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 4 мг (точная навеска) фармакопейного стандартного образца преднизолона (примесь А), 2 мг (точная навеска) фармакопейного стандартного образца кортизона (примесь B), 8 мг (точная навеска) фармакопейного стандартного образца гидрокортизона ацетата (примесь C) и 6 мг (точная навеска) фармакопейного стандартного образца
11-дезоксикортизола (примесь F), растворяют в 40 мл ацетонитрила и доводят объём раствора водой до метки. В мерную колбу вместимостью 5 мл помещают 0,5 мл полученного раствора и доводят объём раствора испытуемым раствором до метки.

Примечание

Примесь А (преднизолон): 11β,17,21-тригидроксипрегна-1,4-диен-3,20-дион [50-24-8].

Примесь В (кортизон): 17,21-дигидроксипрегн-4-ен-3,11,20-трион [53-06-5].

Примесь С (гидрокортизона ацетат): (11β,17-дигидрокси-3,20-диоксопрегн-4-ен-21-ил) ацетат [50-03-3].

Примесь D: 6β,11β,17,21-Тетрагидроксипрегн-4-ен-3,20-дион [53-35-0].

Примесь Е (6-Дегидрокортизол): 11β,17,21-тригидроксипрегна-4,6-диен-3,20-дион [600-99-7].

Примесь F(11-дезоксикортизол): 17,21-дигидроксипрегн-4-ен-3,20-дион [152-58-9].

Примесь G: 11β,17-дигидрокси-3,20-диоксопрегн-4-ен-21-аль, [14760-49-7].

Примесь Н: 7α,11β,17,21-тетрагидроксипрегн-4-ен-3,20-дион.

Примесь I: 11β,14,17,21-тетрагидроксипрегн-4-ен-3,20-дион [103795-84-2].

Примесь N: 11β,17,21-тригидрокси-21-(11β,17,21-тригидрокси-3,20-диоксопрегн-4-ен-21-ил)прегн-4-ен-3,20-дион.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 250 × 4,6 мм, силикагель октадецилсилильный, деактивированный по отношению к основаниям, эндкепированный для хроматографии, 5 мкм; |
| Температура колонки | 25 °С; |
| Скорость потока | 0,8 мл/мин; |
| Детектор | спектрофотометрический, 254 нм; |
| Объём пробы | 10 мкл. |

*Режим хроматографирования*

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Время, мин | ПФА, % | ПФБ, % |
| 0–18 | 74 | 26 |
| 18–32 | 74 → 55 | 26 → 45 |
| 32–48 | 55 → 30 | 45 → 70 |
| 48–50 | 74 | 26 |
| 50–55 | 74 | 26 |

Хроматографируют раствор для идентификации, раствор стандартного образца гидрокортизона, содержащего примеси D, E, G, H, I и N, раствор сравнения и испытуемый раствор.

*Относительное время удерживания соединений.* Гидрокортизон – 1 (около 24 мин); примесь D – около 0,2; примесь Н – около 0,3; примесь I – около 0,5; примесь G – около 0,8; примесь Е – около 0,86; примесь А – около 0,96; примесь В – около 1,1; примесь F – около 1,4; примесь С – около 1,5; примесь N – около 1,7.

*Идентификация примесей.* Для идентификации пиков примесей D, E, G, H, I и N используют хроматограмму стандартного образца гидрокортизона, содержащего примеси D, E, G, H, I и N и хроматограмму, прилагаемую к фармакопейному стандартному образцу гидрокортизона. Для идентификации пиков примесей А, В, С и F используют хроматограмму раствора для идентификации.

*Пригодность хроматографической системы*. На хроматограмме раствора для идентификации *отношение максимум/минимум (p/v)* между пиками примеси А и гидрокортизона должно быть не менее 3,0.

*Поправочные коэффициенты.* Для расчёта содержания площади пиков следующих примесей умножают на соответствующие поправочные коэффициенты: примесь D – 1,8; примесь E – 2,7.

*Допустимое содержание примесей.* На хроматограмме испытуемого раствора:

- площадь пика каждой из примесей С, D, E и I не должна более чем в 5 раз превышать площадь пика гидрокортизона на хроматограмме раствора сравнения (не более 0,5 %);

- площадь пика примеси G не должна более чем в 4 раза превышать площадь пика гидрокортизона на хроматограмме раствора сравнения (не более 0,4%);

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

- площадь пика каждой из примесей А и В не должна превышать 2 площади пика гидрокортизона на хроматограмме раствора сравнения (не более 0,2 %);

- площадь пика каждой из примесей Н и N не должна более чем в 1,5 раза превышать площадь пика гидрокортизона на хроматограмме раствора сравнения (не более 0,15 %);

- площадь пика любой другой примеси не должна превышать площадь пика гидрокортизона на хроматограмме раствора сравнения (не более 0,10 %);

- сумма площадей пиков всех примесей не должна превышать двадцатикратную площадь пика гидрокортизона на хроматограмме раствора сравнения (не более 2,0 %);

Не учитывают пики, площадь которых менее 0,5 площади пика гидрокортизона на хроматограмме раствора сравнения (менее 0,05 %).

**Потеря в массе при высушивании.** Не более 1,0 % (ОФС «Потеря в массе при высушивании», способ 1). Для определения используют 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 0,002 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Тяжёлые металлы» (метод 3Б) в зольном остатке, полученном после сжигания 1,0 г субстанции, с использованием эталонного раствора 2.

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

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

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Определение проводят методом спектрофотометрии (ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях»).

*Испытуемый раствор.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 0,1 г (точная навеска) субстанции, растворяют в спирте 96 % и доводят объём раствора тем же растворителем до метки. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 2,0 мл полученного раствора и доводят объём раствора спиртом 96 % до метки.

Измеряют оптическую плотность полученного раствора на спектрофотометре в максимуме поглощения при длине волны 241,5 нм в кювете с толщиной слоя 1 см. В качестве раствора сравнения используют спирт 96 %.

Содержание гидрокортизона C21H30O5 в субстанциив пересчёте на сухое вещество в процентах (*Х*) вычисляют по формуле:

$$X=\frac{A∙100∙100∙100}{440∙a∙2∙(100-W)},$$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *A* | − | оптическая плотность испытуемого раствора; |
|  | *а* | − | навеска субстанции, г; |
|  | 440 | − | удельный показатель поглощения гидрокортизона ($А\_{1см}^{1\%}$); |
|  | *W* | − | потеря в массе при высушивании, %. |

ХРАНЕНИЕ

В защищённом от света месте.

\*Приводится для информации.