|  |  |
| --- | --- |
| **Печени рыб масло жирное, капсулы**  ***Jecoris pisces oleum pingue*** | **ФС**  **Вводится впервые** |

#### 

Настоящая фармакопейная статья распространяется на лекарственный препарат печени рыб масло жирное, капсулы. Препарат должен соответствовать требованиям ОФС «Капсулы» и ниже приведенным требованиям.

Содержание ретинола должно быть от 425 МЕ до 575 МЕ на среднюю массу капсулы; содержание колекальциферола должно быть от 42,5 МЕ до 57,5 МЕ на среднюю массу капсулы; содержаниие эйкозопентаеновой кислоты должно быть не менее 8 %; докозагексаеновой кислоты – не менее 9 %; сумма полиненасыщенных жирных кислот – не менее 20 %.

**Описание.** Содержание раздела приводится в соответствии с ОФС «Капсулы».

**Подлинность**

1. ***Высокоэффективная жидкостная хроматография*.**

*а*) На хроматограмме испытуемого раствора, полученного для количественного определения ретинола (раздел «Количественное определение**.** Ретинол»), должен регистрироваться основной пик с временем удерживания, соответствующим времени удерживания пика на хроматограмме раствора сравнения.

*б*) На хроматограмме испытуемого раствора, полученного для количественного определения колекальциферола (раздел «Количественное определение**.** Колекальциферол»), должен регистрироваться основной пик с временем удерживания, соответствующим времени удерживания пика на хроматограмме раствора сравнения.

***2. Газовая хроматография*.**

На хроматограмме испытуемого раствора, полученного при испытании по разделу «Состав жирных кислот», должны регистрироваться основные пики с временами удерживания, соответствующие временам удерживания основных пиков на хроматограмме раствора стандартных образцов (эйкозопентаеновая кислота и докозагексаеновая кислота).

**Плотность.** От 0,917 до 0,927 г/см3. Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Плотность».

**Показатель преломления.** От 1,477 до 1,484. Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Рефрактометрия».

**Перекисное число.** Не более 10,0. Определение проводят в соответствии с ОФС «Перекисное число».

**Число омыления**. От 175 до 196. Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Число омыления».

**Йодное число.** От 120 до 175. Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Йодное число».

**Кислотное число.** Не более 2,0. Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Кислотное число».

**Анизидиновое число.** Не более 30,0. Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Анизидиновое число».

**Неомыляемые вещества.** Не более 2,0 %. Испытание проводят весовым методом.

Около 3 г (точная навеска) содержимого капсул помещают в коническую колбу вместимостью 250 мл, прибавляют 50 мл свежеприготовленного раствора калия гидроксида спиртового и кипятят на водяной бане с обратным холодильником в течение 1 ч, периодически перемешивая круговыми движениями. Охлаждают до температуры ниже 25 °С и количественно переносят содержимое колбы в делительную воронку вместимостью 500 мл с помощью 100 мл воды. Полученный раствор осторожно встряхивают с эфиром, свободным от пероксидов, трижды по 100 мл. Все эфирные извлечения собирают в отдельную делительную воронку, в которую предварительно помещают 40 мл воды, осторожно встряхивают в течение нескольких минут, оставляют до полного расслоения смеси, затем отбрасывают водный слой. Эфирный слой промывают двумя порциями воды, по 40 мл каждая. Затем промывают поочередно 40 мл калия гидроксида раствором спиртовым 3 % и 40 мл воды, повторяя данную процедуру три раза. Затем эфирный слой несколько раз промывают 40 мл воды до отсутствия щелочной реакции в водном слое по фенолфталеину. Эфирный слой количественно переносят в доведенную до постоянной массы колбу с помощью эфира, свободного от пероксидов.

Эфир отгоняют с соответствующими предосторожностями и к остатку прибавляют 6 мл ацетона. Затем аккуратно удаляют растворитель в потоке воздуха. Остаток в колбе сушат до постоянной массы при температуре 100-105 °С, охлаждают в эксикаторе и взвешивают.

Содержание неомыляемых веществ в процентах (Х) вычисляют по формуле:

,

где а1 – масса остатка, г;

а – навеска содержимого капсул, г.

Остаток растворяют в 20 мл спирта 96 %, предварительно нейтрализованного по фенолфталеину, и титруют 0,1 М раствором натрия гидроксида спиртовым. Если объем 0,1 М раствора натрия гидроксида спиртового, пошедшего на титрование, более 0,2 мл, расслоение слоев прошло не полностью; при этом взвешенный остаток не может рассматриваться как «Неомыляемые вещества». Испытание следует повторить.

**Стеарин.** 10 мл содержимого капсул нагревают до 60-90 °С, затем охлаждают с помощью ледяной бани до 0 °С и выдерживают в течение 3 ч при этой температуре. Содержимое капсул должно быть прозрачной. При необходимости, отделяют нерастворимые вещества фильтрованием образца после нагревания.

**Тяжелые металлы.** Не более 0,00125 %. В соответствии с требованиями ОФС «Тяжелые металлы».

**Однородность массы.** В соответствии стребованиями ОФС «Однородность массы дозированных лекарственных форм».

**Распадаемость.** Не более 20 мин в соответствии стребованиями ОФС «Распадаемость таблеток и капсул».

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

**Количественное определение.**

**Ретинол.** Определение проводят методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

*Приготовление растворов*

*Раствор стандартного образца (СО) ретинола ацетата*. Около 0,056 г (точная навеска) СО *ретинола ацетата* помещают в коническую колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 0,1 г аскорбиновой кислоты, 30 мл свежеприготовленного калия гидроксида 2 М спиртового раствора, перемешивают и нагревают на водяной бане с обратным холодильником в течение 30 мин, быстро охлаждают и количественно переносят в делительную воронку вместимостью 250 мл при помощи 50 мл воды, полученный раствор осторожно встряхивают с эфиром трижды: один раз по 50 мл и дважды по 30 мл. Объединенные эфирные извлечения промывают 30 мл воды, затем 50 мл раствора калия гидроксида 4 % и снова водой порциями по 40 мл до отсутствия щелочной реакции в водном слое по фенолфталеину. Эфирные извлечения фильтруют через бумажный фильтр, содержащий 8 г натрия сульфата безводного, в круглодонную колбу. Фильтр промывают эфиром трижды по 10 мл в ту же колбу. Эфир отгоняют на ротационном испарителе под вакуумом на водяной бане при температуре не выше 40 °С досуха. Сухой остаток растворяют в 10 мл подвижной фазы и перемешивают (раствор А).

*Раствор сравнения.* 0,3 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят объем раствора подвижной фазой до метки и перемешивают.

Растворы используют свежеприготовленными.

*Испытуемый раствор*. Около 1 г (точная навеска) содержимого капсул помещают в коническую колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 0,1 г аскорбиновой кислоты, 30 мл свежеприготовленного калия гидроксида 2 М спиртового раствора, перемешивают и нагревают на водяной бане с обратным холодильником в течение 30 мин, быстро охлаждают и количественно переносят в делительную воронку вместимостью 250 мл при помощи 50 мл воды, полученный раствор осторожно встряхивают с эфиром трижды: один раз по 50 мл и дважды по 30 мл. Объединенные эфирные извлечения промывают 30 мл воды, затем 50 мл раствора калия гидроксида 4 % и снова водой порциями по 40 мл до отсутствия щелочной реакции в водном слое по фенолфталеину. Эфирные извлечения фильтруют через бумажный фильтр, содержащий 8 г натрия сульфата безводного, в круглодонную колбу. Фильтр промывают эфиром трижды по 10 мл в ту же колбу. Эфир отгоняют на ротационном испарителе под вакуумом на водяной бане при температуре не выше 40 °С досуха. Сухой остаток растворяют в 5 мл подвижной фазы.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 150 мм × 4,6 мм, силикагель октадецилсилильный для хроматографирования, размер частиц 5 мкм |
| Подвижная фаза | метанол для жидкостной хроматографии |
| Температура колонки, °С | 25 |
| Скорость потока, мл/мин | 0,9 |
| Детектор  Длина волны, нм | Спектрофотометрический  300 |
| Объем вводимой пробы, мкл | 20 |
| Время хроматографирования, мин | 12 |

По 20 мкл испытуемого раствора и раствора сравнения вводят в инжектор хроматографа и хроматографируют в указанных выше условиях.

*Проверка пригодности хроматографической системы*.

Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

- эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику ретинола ацетат, должна составлять не менее 5000 теоретических тарелок;

- относительное стандартное отклонение площади пика ретинола ацетата на хроматограмме раствора сравнения не должно превышать 2 %;

- фактор асимметрии пика ретинола ацетата должен быть не более 1,5.

Содержание ретинола ацетата в одной капсуле в международных единицах МЕ (Х) вычисляют по формуле:

где: S– площадь пика ретинола на хроматограмме испытуемого раствора;

Sо – площадь пика ретинола на хроматограмме раствора сравнения;

aо – навеска стандартного образца ретинола ацетата, мг;

а – навеска содержимого капсул, взятая для определения, мг;

G – средняя масса капсулы, г.

Р – содержание основного вещества в СО ретинола ацетата, взятого для приготовления раствора сравнения, МЕ/мг.

**Колекальциферол**. Определение проводят методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, выполняя все операции быстро, избегая воздействия солнечного света и воздуха.

*Приготовление растворов*

*Раствор бутилгидрокситолуола в гексане.* 1 г бутилгидрокситолуола помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 80 мл гексана, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают.

Срок годности раствора 1 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

*Калия гидроксида раствор 80 %.* 80 г калия гидроксида помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в воде, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают.

*Калия гидроксида раствор 3 % в этаноле 10 %.* 6 г калия гидроксида помещают в мерную колбу вместимостью 200 мл, растворяют в 100 мл воды, прибавляют 20 мл этанола безводного, перемешивают, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

*Аскорбиновой кислоты раствор 10 %*. 2,5 г аскорбиновой кислоты помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 15 мл воды, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают.

*Натрия хлорида раствор 1 %.*10 г натрия хлорида помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, растворяют в воде, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Растворы используют свежеприготовленными.

*Раствор стандартного образца колекальциферола*. Около 0,015 г (точная навеска) СО колекальциферола растворяют в мерной колбе вместимостью 50 мл в этаноле, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают. 1 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора этанолом безводным до метки и перемешивают.

*Исходный испытуемый раствор*. Около 10 г (точная навеска) содержимого капсул помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 30 мл гексана, доводят объем раствора гексаном до метки и перемешивают.

*Испытуемый раствор 1*. 20,0 мл исходного испытуемого раствора помещают в коническую колбу вместимостью 250 мл, прибавляют 5 мл свежеприготовленного аскорбиновой кислоты раствора 10 %, 10 мл свежеприготовленного калия гидроксида раствора 80 %, 100 мл этанола, перемешивают и кипятят на водяной бане с обратным холодильником в течение 45 мин в инертной атмосфере. К горячему раствору прибавляют 100 мл натрия хлорида раствора 1 % и охлаждают под струей холодной воды до комнатной температуры. Полученный раствор количественно переносят в делительную воронку вместимостью 500 мл при помощи 75 мл натрия хлорида раствора 1 %, а затем 150 мл смеси эфир-гексан (2 : 1). Содержимое воронки встряхивают в течение 1 мин. После полного разделения нижний слой отделяют, а верхний осторожно, избегая сильного встряхивания, промывают сначала 50 мл калия гидроксида раствором 3 % в этаноле 10 %, а затем – натрия хлорида раствором 1 % три раза по 50 мл. Верхний слой фильтруют через бумажный фильтр с натрия сульфата безводного в круглодонную колбу для ротационного испарителя. Делительную воронку промывают 10 мл смеси эфир-гексан (2:1) и также фильтруют через бумажный фильтр, содержащий 5 г натрия сульфата безводного, в круглодонную колбу для ротационного испарителя. Отгоняют растворитель с помощью ротационного испарителя при пониженном давлении в токе инертного газа и температуре не выше 30 °С досуха. Сухой остаток растворяют в 1,5 мл подвижной фазы (подраздел «Очистка»).

*Испытуемый раствор 2*. К 20,0 мл исходного испытуемого раствора прибавляют 20 мл гексана и далее поступают так, как указано в методике приготовления испытуемого раствора 1, начиная со слов «…помещают в коническую колбу вместимостью 250 мл …».

*Раствор сравнения*. К 5 мл раствора стандартного образца колекальциферола прибавляют 20 мл гексана и далее поступают так, как указано в методике приготовления испытуемого раствора 1, начиная со слов «…помещают в коническую колбу вместимостью 250 мл...».

*Очистка*

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 250 мм × 4,6 мм, силикагель нитрильный, размер частиц 10 мкм |
| Подвижная фаза | изоамиловый спирт – гексан (1,69: 98,4) |
| Температура колонки, °С | 25 |
| Скорость потока, мл/мин | 1,1 |
| Детектор  Длина волны, нм | Спектрофотометрический  265 |
| Объем вводимой пробы, мкл | 350 |

350 мкл раствора сравнения вводят в инжектор хроматографа. Элюат начинают собирать за 2 мин до наступления и в течение 2 мин после наступления времени удерживания холекальциферола в пробирку с притертой пробкой, содержащую бутилгидрокситолуола в гексане. Процедуру повторяют с испытуемыми растворами 1 и 2. Из каждой пробирки удаляют растворитель током азота при температуре не выше 30 °С. Каждый из полученных остатков растворяют в 1,5 мл ацетонитрила.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 150 мм × 4,6 мм, силикагель октадецилсилильный для хроматографирования, размер частиц 5 мкм |
| Подвижная фаза | ацетонитрил – фосфорная кислота концентрированная (99,8:0,2) |
| Температура колонки, °С | 25 |
| Скорость потока, мл/мин | 1,0 |
| Детектор  Длина волны, нм | Спектрофотометрический  265 |
| Объем вводимой пробы, мкл | 50 |

В инжектор хроматографа вводят по 50 мкл каждого из трех растворов, полученных в результате очистки, и хроматографируют в указанных выше условиях.

*Проверка пригодности хроматографической системы*.

Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

- эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику колекальциферола, должна составлять не менее 1000 теоретических тарелок;

- относительное стандартное отклонение площади пика колекальциферола на хроматограмме раствора сравнения не должно превышать 5 %;

- фактор асимметрии пика колекальциферола должен составлять от 0,7 до 1,5.

Содержание колекальциферола в одной капсуле в международных единицах МЕ (Х) вычисляют по формуле:

где: S– площадь пика колекальциферола на хроматограмме испытуемого раствора (1, 2);

Sо – площадь пика колекальциферола на хроматограмме раствора сравнения;

aо – навеска стандартного образца колекальциферола, мг;

а – навеска содержимого капсул, взятая для определения, мг;

G – средняя масса капсулы, г.

Р – содержание основного вещества в СО колекальциферола, %;

40000 – коэффициент пересчета мг колекальциферола в МЕ.

**Состав жирных кислот.** Испытание проводят методом газовой хроматографии (c внутренней нормализацией).

*Приготовление растворов*.

*Натрия метилата раствор*. 4,6 г натрия небольшими порциями растворяют в 100 мл метанола.

*Испытуемый раствор*. 100 мг содержимого капсул помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 15 мл гексана, прибавляют 1,25 мл метилата натрия раствора и подвергают полученный раствор воздействию ультразвука при 40 °С в течение 15 мин. Затем раствор охлаждают до комнатной температуры, доводят объем раствора гексаном до метки и перемешивают. Отделяют верхний гексановый слой и фильтруют через бумажный фильтр («белая лента»), отбрасывая первые 5-10 мл фильтрата. Полученный фильтрат помещают в делительную воронку объемом 100 мл, прибавляют 10 мл воды, тщательно перемешивают и после разделения слоев нижний водный слой сливают. Процедуру повторяют дважды. Промытый таким образом гексановый слой фильтруют через бумажный фильтр («белая лента»), содержащий 8 г натрия сульфата безводного.

*Раствор стандартных образцов*. 25 мг метилового эфира эйкозопентаеновой кислоты и 20 мг метилового эфира докозагексаеновой кислоты растворяют в 10 мл гексана.

*Проверка пригодности хроматографической системы*.

Для проверки пригодности хроматографической системы хроматографируют раствор стандартных образцов, получая не менее 5 хроматограмм в указанных ниже условиях.

Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

- относительное стандартное отклонение, рассчитанное для площадей пиков метиловых эфиров эйкозопентаеновой и докозагексаеновой кислот на хроматограммах раствора стандартных образцов должно быть не более 2 %;

- эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику метилового эфира эйкозопентаеновой кислоты, должна быть не менее 50000 теоретических тарелок;

- разрешение между пиками эйкозопентановой и докозагексановой кислот должно быть не менее 20.

*Хроматографические условия*

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Колонка | | капиллярная с неподвижной фазой поли(диметил)(дифенил)-силоксан размером 30 м × 0,32 мм; толщина слоя 0,1 мкм | |
| Детектор | | пламенно-ионизационный | |
| Газ-носитель  Скорость газа-носителя, см/с | | гелий для хроматографии  20 | |
| Деление потока | | 1:50 | |
| Скорость потока, мл/мин | | 1 | |
| Объём вводимой пробы, мкл | | 0,2 | |
| Время хроматографирования, мин | | 35 | |
| *Температура* | | | | |
|  | Время, мин | | Температура, °C | |
| Колонка | 0 - 8  8 -28  28-33 | | 180  180 → 280 (5 °С/ мин)  280 | |
| Инжектор |  | | 270 | |
| Детектор |  | | 300 | |

Относительное время удерживания метилового эфира эйкозопентаеновой кислоты (относительно метилого эфира докозагексаеновой кислоты) составляет около 0,77 – 0,83.

По 0,2 мкл испытуемого раствора и раствора стандартных образцов хроматографируют попеременно в указанных выше условиях, получая не менее 3 хроматограмм.

Содержание суммы полиненасыщенных кислот вычисляют, учитывая пики метиловых эфиров жирных кислот с относительным временем удерживания от 0,7 до 1,2 (относительно метилого эфира докозагексаеновой кислоты).

**Хранение**. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственных средств».