|  |
| --- |
|  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Эргокальциферол** |  | **ФС** |
| **Эргокальциферол** |  |  |
| **Ergocalciferolum** |  | **Взамен ФС 42-1764-96** |

|  |
| --- |
|  |

|  |  |
| --- | --- |
| (5*Z*,7*E*,22*E*)-9,10-Секоэргоста-5,7,10(19),22-тетраен-3β-ол | |
|  | |
| C28H44O | М.м.396,65 |

Cодержит не менее 97,0 % и не более 103,0 % эргокальциферола C28H44O.

1 мг эргокальциферола C28H44O соответствует 40000 МЕ. В растворе в зависимости от температуры и времени проявляет обратимую изомеризацию до пре-эргокальциферола. Активность обусловлена обоими соединениями.

**Описание.** Белый или слегка желтоватый кристаллический порошок или белые или почти белые кристаллы.

**Растворимость.** Легко растворим в спирте 96 % и метаноле, умерено растворим в растительных маслах, практически нерастворим в воде.

**Подлинность**

*1. ИК-спектрометрия* (ОФС «Спектрометрия в инфракрасной области»). Инфракрасный спектр субстанции, снятый в диске с калия бромидом, в области от 4000 до 600 см-1 по положению полос поглощения должен соответствовать спектру стандартного образца эргокальциферола.

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

**Температура плавления.** От 113 °С до 119 °С (ОФС «Температура плавления», метод 1).

**Удельное вращение.** От +103 до +107 (1,5 % раствор субстанции в спирте 96 %, свободном от альдегидов, ОФС «Поляриметрия»). Раствор субстанции готовят сразу после вскрытия упаковки и используют не позднее чем через 30 мин.

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

Испытания проводят как можно быстрее, защищая все растворы от воздействия света и воздуха.

***Примесь B***

*Подвижная фаза*(*ПФ*)*.* Метанол.

*Испытуемый раствор.* В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 25,0 мг субстанции, растворяют в метаноле и доводят объём раствора тем же растворителемдо метки.

*Раствор стандартного образца эргостерола.* В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 5,0 мг стандартного образца эргостерола (примесь B), растворяют в метаноле и доводят объем раствора тем же растворителем до метки. В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 1,0 мл полученного раствора и доводят объем раствора метанолом до метки.

Примечание.

Примесь B (эргостерол): ((22*E*)-эргоста-5,7,22-триен-3β-ол, CAS 57-87-4.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 250 × 4,6 мм, силикагель октадецилсилильный, эндкепированный для хроматографии, 5 мкм; |
| Температура колонки | 25 °С; |
| Скорость потока | 1,5 мл/мин; |
| Детектор | спектрофотометрический, 282 нм; |
| Объём пробы | 20 мкл; |
| Время хроматографирования | 2,5-кратное от времени удерживания пика эргокальциферола. |

Хроматографируют раствор стандартного образца эргостерола и испытуемый раствор.

*Относительное время удерживания соединений.* Эргокальциферол – 1 (около 7 мин); примесь B– около 1,6.

*Допустимое содержание примесей*. На хроматограмме испытуемого раствора площадь пика примеси B не должна превышать площадь основного пика на хроматограмме раствора стандартного образца эргостерола (не более 0,2 %).

***Другие примеси***

*Подвижная фаза (ПФ).* Вода—метанол 50:950.

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

*Раствор сравнения А.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 1,0 мл испытуемого раствора и доводят объем раствора метанолом до метки.

*Раствор сравнения Б.* В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 5,0 мл раствора сравнения А и доводят объем раствора метанолом до метки.

*Раствор для проверки разделительной способности хроматографической системы.* Растворяют 5 мг стандартного образца эргокальциферола для проверки пригодности системы (содержит примеси A, F и G), в 5,0 мл метанола, нагревают на водяной бане с обратным холодильником при 90 °С в течении 45 мин и охлаждают до комнатной температуры.

Примечание.

Примесь А:(5*E*,7*E*,22*E*)-9,10-секоэргоста-5,7,10(19),22-тетраен-3β-ол, CAS 51744-66-2;

Примесь F: (5*Z*,7*E*,22*E*)-9,10-секоэргоста-5,7,10(19),22,24(24')-пентаен-3β-ол;

Примесь G: (5Z,7*E*)-9,10-секоэргоста-5,7,10(19)-триен-3β-ол, CAS 511-28-4.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 250 × 4,6 мм, силикагель октадецилсилильный для хроматографии, 5 мкм; |
| Температура колонки | 25 °С; |
| Скорость потока | 1,5 мл/мин; |
| Детектор | спектрофотометрический, 254 нм; |
| Объём пробы | 20 мкл; |
| Время хроматографирования | 2-кратное от времени удерживания пика эргокальциферола. |

Хроматографируют раствор для проверки разделительной способности хроматографической системы, раствор сравнения А, раствор сравнения Б и испытуемый раствор.

*Идентификация примесей.* Для идентификации пиков примесей A, F, G и пре-эргокальциферола используется хроматограмма раствора для проверки разделительной способности хроматографической системы и хроматограмма, прилагаемая к стандартному образцу для проверки пригодности системы.

*Относительное время удерживания соединений.* Эргокальциферол – 1 (около 16 мин); примесь F – около 0,7; примесь А – около 0,9; пре-эргокальциферол – около 0,95; примесь G – около 1,2.

*Пригодность хроматографической системы.* На хроматограмме раствора для проверки разделительной способности хроматографической системы:

– *разрешение* (*RS*) между пиками эргокальциферола и примеси G должно быть не менее 4,2;

– *отношение максимум/минимум* (*p/v*) между пиками примеси А и пре-эргокальциферола должно быть не менее 1,2;

– *отношение максимум/минимум* (*p/v*) между пиками пре-эргокальциферола и эргокальциферола должно быть не менее 1,5;

*Допустимое содержание примесей.* На хроматограмме испытуемого раствора:

– площадь пика примеси G не должна превышать 1,5 площади основного пика на хроматограмме раствора сравнения А (не более 1,5 %);

– площади пиков каждой из примесей A и F не должны превышать 0,5 площади основного пика на хроматограмме раствора сравнения А (не более 0,5%);

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

– сумма всех примесей – не более 2,5 %.

Не учитывают пик пре-эргокальциферола и пики, площадь которых составляет менее 0,5 площади основного пика на хроматограмме раствора сравнения Б (менее 0,05 %).

**Восстанавливающие вещества.** Не более 0,002 %. Определение проводят методом спектрофотометрии (ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях»).

*Раствор тетразолиевого синего.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 0,5 г тетразолиевого синего, растворяют в спирте 96 %, свободном от альдегидов, и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

*Испытуемый раствор.* Растворяют 0,1 г субстанции в 10,0 мл спирта 96 %, свободного от альдегидов.

*Стандартный раствор.* Готовят раствор гидрохинона в спирте 96 %, свободном от альдегидов, с концентрацией гидрохинона 0,2 мкг/мл.

*Раствор сравнения.* Спирт 96 %, свободный от альдегидов.

К 10,0 мл каждого раствора прибавляют по 0,5 мл раствора тетразолиевого синего и 0,5 мл тетраметиламмония гидроксида раствора разведённого, выдерживают полученные растворы ровно 5 мин и прибавляют 1,0 мл уксусной кислоты ледяной.

Измеряют оптическую плотность испытуемого и стандартного растворов относительно раствора сравнения на спектрофотометре в максимуме поглощения при длине волны 525 нм в кювете с толщиной слоя 1 см.

Оптическая плотность испытуемого раствора не должна превышать оптическую плотность стандартного раствора.

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

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

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

*Раствор стандартного образца эргокальциферола.* В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают около 25 мг (точная навеска) стандартного образца эргокальциферола, растворяют в метаноле и доводят объём раствора тем же растворителемдо метки.

Хроматографируют раствор стандартного образца эргокальциферола и испытуемый раствор.

Содержание эргокальциферола C28H44O в субстанции () вычисляют по формуле:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *S*1 | − | площадь пика эргокальциферола на хроматограмме испытуемого раствора; |
|  | *S*0 | − | площадь пика эргокальциферола на хроматограмме раствора стандартного образца эргокальциферола; |
|  | *а*1 | − | навеска субстанции, мг; |
|  | *а*0 | − | навеска стандартного образца эргокальциферола, мг; |
|  | *P* | − | содержание эргокальциферола в стандартном образце эргокальциферола, %. |

**Хранение.** В защищённом от света месте при температуре от 2 до 8 °С.