**Бетакаротен+Витамин Е+ ФС**

**Менадион+Ретинол,**

**раствор для местного и**

**наружного применения масляный ФС 42-3182-95**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на комплексный поливитаминный лекарственный препарат Бетакаротен+Витамин Е+Менадион+Ретинол, раствор для местного и наружного применения масляный, применяемый в качестве комбинированного лекарственного средства, оказывающего метаболическое, поливитаминное, противоожоговое действие, а также стимулирующего репарацию и ускоряющего заживление ран.

Действующими веществами препарата являются: Бетакаротен, Витамин Е, Менадион, Ретинол.

Бетакаротен C40H56  - каротиноид, предшественник витамина А.

Витамин Е (или токоферол), представлен 8 молекулами - природные соединения производные  [токола](https://ru.wikipedia.org/w/index.php?title=%D0%A2%D0%BE%D0%BA%D0%BE%D0%BB&action=edit&redlink=1" \o "Токол (страница отсутствует)). Наиболее биологически активной формой из которых является альфа-токоферол C29H50O2.

Менадион C11H8O2 - (2-Methyl-1,4-naphthoquinone, Vitamin K3).

Ретинол С20Н30О — [витамин A](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%92%D0%B8%D1%82%D0%B0%D0%BC%D0%B8%D0%BD_A).

Препарат должен соответствовать требованиям ОФС «Лекарственные формы» и выдерживать испытания, характерные для данной лекарственной формы.

В состав препарата входят вспомогательные вещества.

ИСПЫТАНИЯ

**Описание.** Маслянистая жидкость оранжево - красного цвета.

**Подлинность**

*Витамин А, каротиноиды.* Качественная реакция.

К одной капле препарата прибавляют 1 мл хлороформа и 0,5 мл сурьмы (III) хлорида раствора 23 %; появляется быстро исчезающее зеленовато- синее окрашивание.

*2-метил-1,4-нафтохинон (менадион).* Качественная реакция. К 2 мл препарата прибавляют несколько кристаллов резорцина и перемешивают, затем прибавляют 5 капель серной кислоты концентрированной и снова перемешивают, появляется темно-синее окрашивание.

*Ретинола ацетата и альфа-токоферола ацетат*. Метод ВЭЖХ.

Времена удерживания основных пиков на хроматограммах испытуемого раствора, полученных при количественном определении ретинола ацетата и альфа-токоферола ацетата, должны соответствовать временам удерживания основных пиков на хроматограммах раствора стандартного образца ретинола ацетата и альфа-токоферола ацетата.

Определение проводят по разделу «Количественное определение» в соответствии с ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография» и ОФС «Методы количественного определения витаминов».

**Кислотное число.** Не более 2,0. Определение проводят в соответствие с ОФС «Кислотное число». Около 3 г (точная навеска) препарата помешают в химический стакан вместимостью 100 мл, прибавляют 80 мл этилового спирта 96 %, нейтрализованного до pH 9,9, перемешивают с помощью магнитной мешалки в течение одной мин и титруют натрия гидроксида раствором 0,05 М до pH 9,9 (потенциометрически).

Плотность. От 0,916 до 0,922. Определение проводят в соответствии с ОФС «Плотность» Метод 1.

Показатель преломления. От 1,470 до 1,485. Определение проводят в соответствии с ОФС «Рефрактометрия».

Масса (объем) содержимого упаковки. Должен соответствовать требованиям ОФС «Масса (объем) содержимого упаковки».

Микробиологическая чистота. Должен выдерживать требования по категории 2. (табл. 1) для производства наружных лекарственных препаратов согласно ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение

*Бетакаротен.*Содержание бетакаротена в препарате должно быть не менее -1,8 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Методы количественного определения витаминов» определение β-каротина и ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях»

*Испытуемый раствор.* Около 0,1 г (точная навеска) препарата растворяют в циклогексане в мерной колбе вместимостью 100 мл, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают. Измеряют оптическую плотность полученного раствора на спектрофотометре при длине волны 455 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

*Раствор сравнения.* В качестве раствора сравнения используют растворитель - циклогексан.

Содержание бетакаротена (X) в мг % вычисляют по формуле:

Х = =,

где: А455 - значение оптической плотности раствора испытуемого образца;

а - навеска препарата, г;

100 – разведение испытуемого раствора, мл;

2500 - удельный показатель поглощения бетакаротена в циклогексане при длине волны 455 нм;

*Ретинола ацетат и альфа -**токоферола ацетат.* Содержание ретинола ацетата в 1 мл препарата должно быть от 2540 до 3110 ME, альфа-токоферола ацетата - от 0,16 до 0,20 %.

Определение проводят методом ВЭЖХ в соответствии с ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография» и методом «Абсорбционной спектрофотометрии».

Стандартный образец.

Ретинола ацетат с содержанием 1000000 МЕ/г ,

альфа-токоферола ацетат с содержанием не менее 96,5 % α-токоферола ацетата.

*Раствор тетраметиламмония в 2-пропаноле.* 0,5 г тетраметиламмония хлорида помещают в колбу вместимостью 250 мл, прибавляют 50 мл 2-пропанола и перемешивают до растворения на механическом встряхивателе.

Испытуемый раствор. Около 0,92 г (точная навеска) препарата помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 2,5 мл гептана, прибавляют 10 мл тетраметиламмония хлорида раствора в 2-пропаноле, перемешивают, доводят объем раствора 2-пропанолом до метки и перемешивают. 2 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят объем раствора 2-пропанолом до метки, перемешивают и фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

*Раствор стандартного образца (СО) ретинола ацетата и альфа-токоферола ацетата.* Около 0,028 г (точная навеска) СО ретинола ацетата с содержанием 1000000 МЕ/г и 0,018 г (точная навеска) СО альфа-токоферола ацетата помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 5 мл гептана, прибавляют 20 мл тетраметиламмония хлорида раствора в 2-пропаноле, перемешивают, доводят объем раствора 2-пропанолом до метки и вновь перемешивают. 1 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора 2-пропанолом до метки, перемешивают и фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

*Подвижная фаза* – метанол.

Точная концентрация ретинола ацетата определяется методом абсорбционной спектрофотометрии. Около 0,025 г (точная навеска) СО ретинола ацетата помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 5 мл пентана, доводят объем раствора 2-пропанолом до метки и перемешивают. 1 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора 2-пропанолом до метки и перемешивают (концентрация 10 МЕ/мл).

Подтверждают наличие максимума поглощения раствора ретинола ацетата в диапазоне длин волн от 325 нм до 327 нм, и измеряют оптические плотности при длинах волн 300, 326, 350 и 370 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют 2-пропанол. Повторяют измерения при каждой из перечисленных длин волн и определяют средние значения. Вычисляют отношение Аλ/А326 для каждой длины волны.

Отношения значений оптических плотностей Аλ/А326 должны быть подтверждены. Если полученные отношения не превышают: значений 0,60 при длине волны 300 нм, 0,54 при λ 350 нм, 0,14 при λ 370 нм, вычисляют содержание ретинола ацетата (X) в 1 грамме в Международных Единицах по формуле:

Х= ,

где: А326 – значение оптической плотности при λ 326 нм;

а - навеска СО ретинола ацетата, г;

50, 50 -разведения, мл;

1900 - коэффициент пересчета удельного показателя поглощения эфиров ретинола в Международные Единицы на грамм.

Хроматографические условия:

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка: | 150×4,6 мм, октадецилсилилсиликагель, 5 мкм; |
| Скорость потока: | 1,0 мл/мин |
| Температура колонки: | 25 °С |
| Температура пробы: | 15 °С |
| Детектор: | УФ - 285 нм для альфа-токоферола ацетата  УФ - 325 нм для ретинола ацетата |
| Объемы пробы: | 20 мкл |
| Время хроматографирования: | 10 мин |
| Время выхода пика  ретинола ацетата  Время выхода пика  альфа – токоферола ацетата | около 3 мин  около 6 мин |

Хроматографируют растворы СО альфа-токоферола ацетата при длине волны 285 нм и СО ретинола ацетата при длине волны 325 нм, получая не менее 5 хроматограмм. Результаты анализа считаются достоверными, если выполняются требования теста «Проверка пригодности хроматографической системы».

Хроматографическая система считается пригодной, если:

* относительное стандартное отклонение площадей пиков ретинола ацетата и альфа-токоферола ацетата не более 2 %;
* разрешение между пиками ретинола ацетата и альфа-токоферола ацетата, рассчитанное по хроматограмме, полученной при длине волны 285 нм, не менее 3;
* эффективность колонки, рассчитанная по пику альфа-токоферола ацетата, не менее 2000 теоретических тарелок;
* фактор асимметрии пика (AS) ретинола ацетата не более 2,

альфа - токоферола ацетата - не более 2.

Затем хроматографируют испытуемый раствор при длине волны 285 нм и 325 нм, получая не менее 3 хроматограмм. Время регистрации хроматограммы испытуемого раствора около 30 мин, время выхода пика ретинола ацетата около 3 мин, время выхода пика альфа - токоферола ацетата около 6 мин.

Содержание ретинола ацетата (X) в 1 мл в ME (МЕ/мл) вычисляют по формуле:

# *Х = =,*

где: S - площадь пика ретинола ацетата на хроматограмме испытуемого раствора;

S0 - площадь пика СО ретинола ацетата на хроматограмме раствора;

а0- навеска СО ретинола ацетата г;

а - навеска препарата г;

Р - содержание основного вещества в СО ретинола ацетата МЕ/г;

- плотность препарата г/см3;

2, 10, 25, 25, 50 - разведения мл.

Содержание альфа - токоферола ацетата (X) в процентах вычисляют по формуле:

# *Х = =,*

где: S - площадь пика альфа - токоферола ацетата на хроматограмме

испытуемого раствора;

S0 — площадь пика СО альфа - токоферола ацетата на хроматограмме раствора;

# а0 - навеска СО альфа - токоферола ацетата г;

а - навеска препарата г;

Р - содержание основного вещества в СО альфа - токоферола ацетата %;

р - плотность препарата г/см3;

2, 10, 25, 25, 50 - разведения мл;

*Менадион (2-метил-1,4-нафтохинон).* От 0,04 до 0,06 %. Определение проводят титриметрическим методом.

*Раствор о-фенантролина*. 0,15 г о-фенантролина растворяют в 10 мл железа (II) сульфата раствора (1,48 г железа (II) сульфата растворяют в 100 мл воды перед приготовлением раствора).

*Испытуемый* раствор. Около 5 г (точная навеска) препарата растворяют в 15 мл уксусной кислоты ледяной в колбе вместимостью 250 мл.

К испытуемому раствору прибавляют 15 мл хлористоводородной кислоты разведенной 8,3 %, 3 г цинка порошка, перемешивают и оставляют, на 30 мин в темном месте, периодически перемешивая. Содержимое колбы быстро фильтруют через слой ваты в коническую колбу вместимостью 500 мл. Остаточное содержимое колбы и фильтр тотчас промывают свежепрокипяченной и охлажденной до комнатной температуры водой до нейтральной реакции ( индикатор метиловый оранжевый), присоединяя промывные воды к основному раствору. Общий объем промывных вод составляет около 250 мл. К полученному раствору прибавляют 2,0 мл раствора о-фенантролина и титруют 0,01 М раствором аммония церия (IV) сульфата до появления голубого окрашивания.

В течение одной мин окраска раствора должна оставаться без изменения.

Параллельно проводят контрольный опыт.

Содержание 2-метил-1,4-нафтохинона (менадиона) (Х) в процентах вычисляют по формуле:

Х=

где: V1 - объем 0,01 М раствора аммония церия (IV) сульфата, пошедшего на титрование испытуемого образца, миллилитрах;

V2 - объем 0,01 М раствора аммония церия (IV) сульфата, пошедшего на титрование контрольного опыта, миллилитрах;

p - плотность препарата г/мл;

0,0008609 - количество 2-метил-1,4 - нафтохинона, соответствующее 1 мл 0,01 М раствора аммония церия (IV) сульфата, граммах;

а - навеска препарата, граммах.

*Бутилокситолуол.* Не более 0,02 %. Определение проводят методом ВЭЖХ в соответствии с ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография».

*Испытуемый раствор.* Около 0,3 г (точная навеска) препарата помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 20 мл гексана, доводят объем раствора гексаном до метки, перемешивают и фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. Раствор используют в день приготовления.

*Стандартный образец*. Бутилгидрокситолуол 10 мг/мл раствор в метиленхлориде, (analytical standard) в ампулах.

*Подвижная фаза* - гексан

*Раствор стандартного образца бутилгидрокситолуола.* Около 0,02 г (точная навеска) бутилгидрокситолуола помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 10 мл гексана, доводят объем раствора гексаном до метки и перемешивают. 1 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора гексаном до метки и перемешивают. 1 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора гексаном до метки, перемешивают и фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

*Хроматографические условия:*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка: | 250 × 4,6 мм; октадецилсилилсиликагель, 5 мкм |
| Температура колонки: | 25 °С |
| Детектор | УФ, 280 нм |
| Скорость потока: | 1,0 мл/мин |
| Объем пробы: | 20 мкл |

Хроматографируют раствор СО бутилгидрокситолуола, получая не менее 5 хроматограмм. Результаты анализа считаются достоверными, если выполняются требования теста «Проверка пригодности хроматографической системы».

Хроматографическая система считается пригодной, если:

* относительное стандартное отклонение площади пика бутилгидрокситолуола не более 2 %;
* эффективность колонки не менее 2000 теоретических тарелок;
* фактор асимметрии пика (AS) не более 2.

Хроматографируют испытуемый раствор, не менее 3 повторностей.

Содержание бутилокситолуола (X) в процентах вычисляют по формуле:

# *Х = =,*

где: S - площадь пика бутилгидрокситолуола на хроматограмме испытуемого раствора;

S0 - площадь пика СО бутилгидрокситолуола на хроматограмме раствора;

а0 - навеска СО бутилгидрокситолуола г;

а - навеска препарата в г;

Р - содержание основного вещества в СО бутилгидрокситолуола, %;

р - плотность препарата г/см ;

25, 25, 25, 50 - разведения в мл;

**Упаковка и маркировка.** В соответствии с ОФС «Лекарственные формы», ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».

# Транспортирование и хранение. В защищенном от света месте, при температуре не выше 20 °С. В соответствии с ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».