**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |
| --- |
|  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Желчь крупного рогатого скота жидкая** |  | **ФС** |
| **Желчь** |  |  |
| **Bilis pecoralis liquida** |  | **Вводится впервые** |

|  |
| --- |
|  |

Настоящая фармакопейная статья распространяется на фармацевтическую субстанцию желчи крупного рогатого скота жидкую.

Субстанция должна содержать не менее 20,0 % желчных (холевых) кислот в пересчете на сухое вещество.

Субстанция должна производиться из сырья, полученного от животных, у которых отсутствуют заболевания вирусной, бактериальной, микоплазменной, прионной этиологии, патогенные для человека.

Субстанция «Желчь крупного рогатого скота жидкая» должна соответствовать ОФС «Фармацевтические субстанции животного происхождения» и нижеприведённым требованиям.

**Описание.** Густая жидкость или пастообразная масса темно-коричневого с зелено­ватым оттенком цвета с характерным, но не гнилостным запахом.

**Подлинность**

1. *Спектрофотометрия.* УФ-спектр поглощения раствора Б (раздел

«Количественное определение») в области от 240 до 380 нм должен соответствовать спектру аналогичного раствора стандартного образца холевой кислоты и должен иметь максимум поглощения при длине волны (314 ± 5) нм (желчные кислоты).

1. *ТСХ.* Определение проводят методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) в соответствии с ОФС «Тонкослойная хроматография».

Основная зона адсорбции на хроматограмме испытуемого раствора по величине и окраске должна соответствовать основной зоне адсорбции на хроматограмме раствора стандартного образца холевой кислоты.

*Пластинка.* ТСХ пластинка со слоем силикагеля.

*Подвижная фаза (ПФ).* Уксусная кислота—спирт 96 %—хлороформ 1:1:8.

*Испытуемый раствор.* В коническую колбу со шлифом вместимостью 100 мл помещают 0,2 г субстанции, добавляют 20 мл аммиака раствора 10 % и нагревают на водяной бане с обратным холодильником в течение 30 мин. Затем колбу охлаждают, содержимое колбы переносят в делительную воронку, добавляют 5 мл хлористоводородной кислоты концентрированной и обрабатывают смесью спирт 96 %—хлороформ 1:4 (далее хлороформно-спиртовая смесь) дважды (порциями по 20 мл), каждый раз взбалтывая в течение 2 мин. Хлороформно-спиртовые экстракты объединяют, фильтруют через фильтр с 2 г натрия сульфата безводного в колбу для отгонки, затем упаривают на роторном испарителе при температуре водяной бани (65 ± 5) °С до полного удаления органических растворителей. Остаток смешивают с 5 мл спирта 96 % и фильтруют.

*Раствор стандартного образца холевой кислоты.* Около 0,05 г (точная навеска) холевой кислоты помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 15 мл спирта 96 % и доводят объем раствора тем же растворителем до метки.

*Реактив для детектирования.* Ванилина раствор 1 % в серной кислоте.

На линию старта хроматографической пластинки с силикагелем наносят по 5 мкл испытуемого раствора и раствора стандартного образца холевой кислоты в виде полос шириной около 10 мм. Пластинку с нанесенными пробами высушивают на воздухе в течение 15 мин, помещают в хроматографическую камеру, предварительно насыщенную парами ПФ, и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт ПФ пройдет 80 - 90 % длины пластинки от линии старта, пластинку вынимают из на воздухе в течение 30 мин. Затем пластинку опрыскивают реактивом для детектирования, выдерживают в сушильном шкафу при (103 ± 2) °С в течение 5 - 10 мин и, просматривая при видимом свете, сравнивают окраску зон адсорбции испытуемого препарата и раствора стандартного образца холевой кислоты.

*Пригодность хроматографической системы*

Хроматографическая система считается пригодной, если на хроматограмме раствора стандартного образца холевой кислоты четко видна зона адсорбции с фактором удерживания (Rf) от 0,25 до 0,50.

На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаруживаться зона адсорбции от светло-фиолетового с зеленоватым оттенком до розово-красного с фиолетовым оттенком цвета на уровне зоны адсорбции схожего цвета на хроматограмме раствора стандартного образца холевой кислоты. Допускается также наличие других зон адсорбции, в том числе на линии старта, которые не учитываются.

1. *Качественная реакция.* Растворяют в пробирке 0,2 г субстанции в 10 мл воды, добавляют 2 капли сахарозы раствора 10 % и перемешивают. К содержимому пробирки по стенке осторожно приливают 3 мл серной кислоты концентрированной. Должно наблюдаться характерное красновато-фиолетовое окрашивание (желчные кислоты).

**рН.** От 6,0 до 8,0 (4 % водный раствор). Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия», метод 3.

**Потеря в массе при высушивании.** Не более 50,0 % (ОФС «Потеря в массе при высушивании»).

**Тяжелые металлы.** Не более 0,01 %. К 1 г субстанции добавляют 1 мл серной кислоты концентрированной, осторожно сжигают и прокаливают. Остаток обрабатывают при нагревании с 5 мл аммония ацетата насыщенного раствора. Полученную смесь фильтруют в мерную колбу вместимостью 100 мл. Фильтр промывают 5 мл воды и доводят объем раствора водой до метки. 10 мл полученного раствора субстанции должны выдерживать испытание на тяжелые металлы в соответствии с ОФС «Тяжёлые металлы» (метод 1).

**Микробиологическая чистота.** Испытание проводят в соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота» (категория 3.2).

**Количественное определение.** Определение проводят методом спектрофотометрии в соответствии с ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях».

*Испытуемый раствор А.* Около 0,25 г (точная навеска) субстанции помещают в коническую колбу со шлифом вместимостью 100 мл, добавляют 30 мл натрия гидроксида раствора 10 % и нагревают на водяной бане с обратным холодильником в течение 1 ч. Колбу охлаждают, к её содержимому осторожно добавляют 10 мл хлористоводородной кислоты концентрированной и перемешивают. После охлаждения реакционной массы в колбу добавляют 20 мл смеси спирт 96 %— хлороформ 1:4 и перемешивают на магнитной мешалке в течение 10 мин.

Содержимое колбы переносят в делительную воронку вместимостью 250 мл, колбу ополаскивают 10 мл хлороформно-спиртовой смеси, которые помещают в ту же делительную воронку. После полного разделения фаз нижний хлороформно-спиртовый слой сливают. Обработку водного слоя повторяют той же хлороформно-спиртовой смесью еще 2 раза (порциями по 15 мл), каждый раз взбалтывая в течение 2 мин.

Хлороформно-спиртовые экстракты объединяют в другой делительной воронке вместимостью 250 мл, добавляют 20 мл воды и взбалтывают в течение 2 мин. После полного разделения фаз нижний хлороформно-спиртовый слой фильтруют через фильтр с 3 г натрия сульфата безводного в колбу для отгонки.

Фильтрат упаривают на роторном испарителе при температуре водяной бани (65 ± 5) °С до полного удаления органических растворителей. Остаток смешивают с 20 мл спирта 96 % и количественно с помощью того же спирта переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл. Объем раствора в мерной колбе доводят спиртом 96 % до метки, перемешивают, затем фильтруют, отбрасывая первые порции фильтрата.

*Испытуемый раствор Б.* В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 1,0 мл раствора А, добавляют 15 мл серной кислоты концентрированной, перемешивают, затем доводят объем раствора серной кислотой концентрированной до метки и перемешивают в сухом стакане (вместимостью 50 мл).

*Контрольный раствор.* В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 1,0 мл спирта 96 %, добавляют 15 мл серной кислоты концентрированной, перемешивают, затем доводят объем раствора серной кислотой концентрированной до метки и перемешивают (в сухом стакане вместимостью 50 мл).

*Проведение анализа и оценка результатов*

Оптическую плотность раствора Б измеряют при 314 нм в кювете с толщиной слоя 1 см относительно контрольного раствора (через 10 минут после приготовления раствора Б и контрольного раствора).

Если значение оптической плотности превышает 0,8; испытуемый раствор перед спектрофотометрированием разводят серной кислотой концентрированной, рассчитывая при этом фактор разведения (F).

Содержание желчных кислот в субстанции *(X,* %) в пересчете на сухое вещество вычисляют по формуле:

$X=\frac{A ∙ F ∙250000 }{m ∙ \left(100-W\right) ∙ A\_{1\%, 1 см} },$где

А - оптическая плотность испытуемого раствора Б;

m - навеска субстанции, г;

*F* - коэффициент разведения;

*A1%, 1 см* ***-*** удельный показатель поглощения продуктов реакции холевой кислоты с серной кислотой концентрированной в условиях анализа (*A1%, 1 см = 204);*

W - потеря в массе при высушивании, %.

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