**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |  |
| --- | --- |
| **Смесь глицеридов насыщенных жирных кислот + Сои культурной плодов сумма фосфолипидов** | **ФС** **Вводится впервые** |

Настоящая фармакопейная статья распространяется на смесь глицеридов насыщенных жирных кислот и сумму фосфолипидов, полученных из сои культурной плодов - *Glicine max* L., сем бобовые - *Fabaceae*, применяемые для производства лекарственных препаратов.

Содержит смеси глицеридов насыщенных жирных кислот не менее 22 % и не более 27 %, суммы фосфолипидов не менее 73 % и не более 78 %.

Описание. Однородная масса с консистенцией от мазеобразной до более плотной желто-коричневого или коричневого цвета.

Растворимость. Растворим в спирте 96 %, хлороформе, эфире.

**Подлинность**.

*Высокоэффективная жидкостная хроматография.* Время удерживания основных пиков на хроматограмме испытуемого раствора должно соответствовать времени удерживания основных пиков на хроматограмме стандартного раствора (раздел «Количественное определение»).

**Перекисное число**. Не более 10,0. В соответствии с ОФС «Перекисное число».

**Вода**. Не более 2,0 %. В соответствии с ОФС «Определение воды».

**Сульфатная зола**. Не более 10,0 %. В соответствии с ОФС «Сульфатная зола».

Для определения используют около 1,0 г (точная навеска) субстанции.

**Тяжелые металлы**. Не более 0,001 %. Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Тяжелые металлы».

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

**Количественное определение**

***Сумма фосфолипидов****.*Определение суммы фосфолипидов проводят расчетным методом по фосфору**.**

а) *Определение фосфора*. Содержание фосфора должно быть не менее 2,6 % и не более 2,9 %. Определение проводят спектрофотометрическим методом.

*Приготовление растворов.*

*Минерализующая смесь:* Концентрированную азотную кислоту, хлорную кислоту и концентрированную серную кислоту смешивают в соотношении 9:9:3.

*Окрашивающий реактив:* Равные объемы азотной кислоты разведенной 16 %, аммония ванадата раствора 0,25 % и аммония молибдата раствора 0,5 % смешивают в указанной последовательности. Полученный раствор должен быть полностью прозрачным и иметь слабо-желтую окраску.

*Приготовление стандартного раствора калия фосфата однозамещенного:* 0,9588 мг калия фосфата однозамещенного, высушенного до постоянной массы при температуре 103 оС в течение 3 ч, помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, растворяют в воде, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

*Определение калибровочного фактора.*

*Приготовление калибровочных растворов:* В 5 мерных колб вместимостью 100 мл помещают соответственно 1, 2, 3, 5 и 6 мл стандартного раствора калия фосфата однозамещенного. В каждую колбу прибавляют 1 мл азотной кислоты разведенной 16 % и 50 мл окрашивающего реактива, доводят объемы растворов водой до метки и перемешивают. Калибровочные растворы содержат 0,218; 0,436; 0,654; 1,090 и 1,308 мг фосфора соответственно.

*Приготовление контрольного раствора:* 1 мл азотной кислоты разведенной 16 % помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл окрашивающего реактива, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Оптическую плотность калибровочных растворов определяют через 40 мин на спектрофотометре при длине волны 425 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм относительно контрольного раствора.

Значение калибровочного фактора (*F*) (мг фосфора на 100 мл раствора) вычисляют по формуле:

$$F=\frac{\sum\_{}^{}Ф\_{i}}{\sum\_{}^{}A\_{i}}$$

где: $Ф\_{i}$- содержание фосфора в 100 мл i-го калибровочного раствора, мг;

 $A\_{i}$ - оптическая плотность i-го калибровочного раствора.

*Примечание*. Значение F периодически проверяют по калибровочным растворам не менее чем двух разных концентраций.

Около 25 мг (точная навеска) субстанции помещают в пробирку (18 × 1,6 см) и прибавляют 1,5 мл минерализующей смеси. Пробирку накрывают часовым стеклом, погружают на глубину около 2 см в нагревательный блок и выдерживают при температуре 220 оC не менее 3 ч. После охлаждения полученный раствор должен быть прозрачным и бесцветным. При необходимости минерализацию повторяют в течение более длительного срока при более высокой температуре.

Раствор количественно переносят в стакан вместимостью 50 мл, ополаскивая пробирку водой, доводят pH раствора до 7,0 (потенциометрически) концентрированным раствором аммиака, затем прибавляют 0,15-0,20 мл азотной кислоты разведенной 16 %; раствор должен оставаться бесцветным. Содержимое стакана количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл окрашивающего реактива, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Оптическую плотность испытуемого раствора измеряют на спектрофотометре при длине волны 425 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм относительно контрольного раствора, приготовленного аналогичным образом из 1,5 мл минерализующей смеси.

Содержание фосфора в субстанции в процентах (*Ф*) вычисляют по формуле:

$$Ф=\frac{A\_{S}∙100∙F}{а}$$

где: *As* – оптическая плотность испытуемого раствора;

 *F* – калибровочный фактор, мг/мл;

 а – навеска субстанции, мг.

За окончательный результат испытания принимают среднее значение из результатов 3 параллельных определений, расхождение между которыми должно быть в пределах ± 0,1 %.

б) *Определение суммы фосфолипидов.*

Содержание суммы фосфолипидов в субстанции в процентах (*М*) вычисляют на основании результата определения фосфора по формуле:

*М* = $Ф$ × 28,01

где: $Ф$ - содержание фосфора в субстанции, %;

 28,01 - коэффициент соотношение между средней молекулярной массой суммы фосфолипидов и атомным весом фосфора.

в) *Определение* *фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина.* Определение проводят методом высокоэффективной жидкостной хроматографией.

Содержание в сумме фосфолипидах фосфатидилхолина должно быть от 73 % до 79 %, фосфатидилэтаноламина - не более 7 %.

*Приготовление растворов*

*Аммония ацетата раствор 0,005М.*В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 0, 385 г аммония ацетата, растворяют в воде, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

*Раствор стандартных образцов (СО) фосфатидилэтаноламина и лизофосфатидилхолина.* Около 25 мг (точная навеска) СО фосфатидилэтаноламина и около 25 мг (точная навеска) СО лизофосфатидилхолина помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 10 мл подвижной фазы и растворяют в ультразвуковой бане. Раствор охлаждают до комнатной температуры, доводят объем раствора подвижной фазой до метки и перемешивают.

*Стандартный раствор.* Около 25 мг (точная навеска) СО фосфатидилхолина помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 10 мл подвижной фазы и растворяют в ультразвуковой бане. Охлаждают раствор до комнатной температуры, прибавляют 2,0 мл раствора СО фосфатидилэтаноламина и лизофосфатидилхолина, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают. В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 5,0 мл полученного раствора, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают.

Растворы используют свежеприготовленными.

*Проверка пригодности хроматографической системы.*

 Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

- эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику фосфатидилхолина, должна быть не менее 1000 теоретических тарелок;

- фактор асимметрии пика фосфатидилхолина должен быть не более 2;

- относительное стандартное отклонение времени удерживания фосфатидилхолина должно быть не более 2 %;

 - относительное стандартное отклонение площади пика фосфатидилхолина должно быть не более 5 %;

- относительное стандартное отклонение площади пика фосфатидилэтаноламина должно быть не более 5 %;

- разрешение между пиками фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина должно быть не менее 8,0;

- разрешение между пиками фосфатидилхолина и лизофосфатидилхолина должно быть не менее 3,0.

Около 25 мг (точная навеска) субстанции помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в подвижной фазе, используя ультразвуковую баню, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают (испытуемый раствор).

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка  | 250 мм × 4,6 мм, силикагель для хроматографии, толщина слоя 5 мкм |
| Подвижная фаза | 2-пропанол – гексан – аммония ацетата раствор 0,005 М (73:10:17) |
| Температура колонки, °С | 40 |
| Скорость потока, мл/мин | 1,2  |
| ДетекторДлина волны, нм | Спектрофотометрический200 |
| Объем вводимой пробы, мкл | 20  |
| Время хроматографирования, мин | 20 |

Хроматографируют стандартный раствор, получая не менее 6 хроматограмм, и вычисляют среднее значение площади пиков. Результаты считаются достоверными, если выполняются требования теста «Проверка пригодности хроматографической системы».

Хроматографируют испытуемый раствор, получая не менее 2 хроматограмм.

Время удерживания пика фосфатидилхолина- около 9 мин, относительное время удерживания пиков: фосфатидилэтаноламина - около 0,3; лизофосфатидилхолина - около 1,77.

Содержание фосфатидилхолина в сумме фосфолипидах в пересчете на безводное вещество в субстанции в процентах (*ФХ*) вычисляют по формуле:

$$ФХ=\frac{S\_{1}∙a\_{1}∙5∙25∙100∙100∙Р}{S\_{01}∙a\_{}∙25∙10∙М∙(100-W)}=\frac{S\_{1}∙a\_{1}∙5000∙Р}{S\_{01}∙a\_{}∙М∙(100-W)} $$

где: S1– средняя площадь пика фосфатидилхолина на хроматограмме испытуемого раствора;

 S01– средняя площадь пика фосфатидилхолина на хроматограмме стандартного раствора;

 *а*– навеска субстанции, мг;

 *а1*– навеска СО фосфатидилхолина, мг;

 *Р*– содержание основного вещества в СО фосфатидилхолина, %;

 *W* – суммарное содержание воды в субстанции, %;

 *М* – содержание суммы фосфолипидов, %.

Содержание фосфатидилэтаноламина в сумме фосфолипидах в пересчете на безводное вещество в субстанции в процентах (*ФЭ*) вычисляют по формуле:

$$ФЭ=\frac{S\_{2}∙a\_{2}∙2∙25∙5∙100∙P∙100 ∙100}{S\_{02}∙a\_{}∙25∙25∙10∙М∙100 ∙(100-W)}=\frac{S\_{2}∙a\_{2}∙400∙Р}{S\_{02}∙a\_{}∙М∙(100-W)}$$

где: *S2*– средняя площадь пика фосфатидилэтаноламина на хроматограмме испытуемого раствора;

 *S02*– средняя площадь пика фосфатидилэтаноламина на хроматограмме стандартного раствора;

 *а*– навеска субстанции, мг;

 *а2*– навеска СО фосфатидилэтаноламина, мг;

 *Р*– содержание основного вещества в СО фосфатидилэтаноламина, %;

 *W* – суммарное содержание воды в субстанции, %;

 *М* – содержание суммы фосфолипидов, %.

*г)**Определение α-токоферола*. Определение проводят спектрофотометрическим методом.

Содержание в сумме фосфолипидах *α*-токоферола должно быть от 0,2 % до 0,5 %.

*Приготовления адсорбента*: 1000 г силикагеля для колоночной хроматографии с размером частиц 0,06-0,20 мм смешивают с 150 мл воды в колбе со шлифом и оставляют на 24 ч, периодически встряхивая.

*Приготовление колонки:* 15 г подготовленного адсорбента смешивают в 25 мл эфира и полученной суспензией заполняют хроматографическую колонку диаметром 1-2 см. Когда над адсорбентом остается слой эфира толщиной около 1 см избыток эфира сливают.

Около 500 мг (точная навеска) субстанции помещают в коническую колбу вместимостью 50 мл и растворяют в 15 мл эфира. Полученный раствор количественно наносят на колонку. Открывая кран, позволяют нанесенному раствору впитаться в слой адсорбента.

Элюат собирают в круглодонную колбу вместимостью 250 мл. Коническую колбу дважды ополаскивают эфиром порциями по 15 мл, каждый раз количественно перенося промывной эфир на колонку. После проникновения последней порции промывного эфира в слой адсорбента через колонку пропускают еще 100-105 мл эфира. Объединенный эфирный элюат упаривают досуха на роторном испарителе, продувают током азота,  растворяют в этаноле 3 порциями по 15 мл, количественно перенося в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят тем же растворителем до метки и перемешивают.

2,0 мл полученного раствора помещают в светонепроницаемую пробирку с притертой пробкой, прибавляют 0,1 мл железа(III) хлорида раствора в этаноле 0,3 %, быстро добавляют 0,1 мл 2,2'-бипиридина раствора в этаноле 0,25 % и перемешивают (испытуемый раствор).

2,0 мл этанола помещают в светонепроницаемую пробирку с притертой пробкой, прибавляют 0,1 мл железа(III) хлорида раствора в этаноле 0,3 %, быстро добавляют 0,1 мл 2,2'-бипиридина раствора в этаноле 0,25 % и перемешивают (контрольный раствор).

Оптическую плотность испытуемого раствора измеряют сразу по истечении 10 мин на спектрофотометре при длине волны 520 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют этанол.

Параллельно измеряют оптическую плотность контрольного раствора в тех же условиях. В качестве раствора сравнения используют этанол.

Содержание α-токоферола (*Т*) в сумме фосфолипидах в процентах рассчитывают по формуле:

$Т=\frac{\left(A\_{s}-A\_{k}\right) ∙50 ∙ 2,2 ∙ 100 ∙ 100}{\begin{array}{c}\begin{array}{c}A\_{1см}^{1\%} ∙ а \end{array}∙ 2 ∙ 100 ∙ M\end{array}}$ $=\frac{\left(A\_{s}-A\_{k}\right) ∙ 5500}{\begin{array}{c}A\_{1см}^{1\%} ∙ а \end{array}∙ M}$

где: *Аs*– оптическая плотность испытуемого раствора;

 *Аk*– оптическая плотность контрольного раствора;

 а – навеска субстанции, г;

 $A\_{1см}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения комплекса α-токоферола при длине волны 520 нм, равный 394;

 *M* – содержание суммы фосфолипидов, %.

***Смесь глицеридов насыщенных жирных кислот.*** Определение проводят гравиметрическим методом.

 Около 500 мг (точная навеска) субстанции помещают в коническую колбу вместимостью 50 мл и растворяют в 15 мл эфира. Полученный раствор количественно наносят на колонку (приготовление см. в разделе «Определение α-токоферола»). Открывая кран, позволяют нанесенному раствору впитаться в слой адсорбента.

Элюат собирают в предварительно взвешенную круглодонную колбу вместимостью 250 мл. Коническую колбу дважды ополаскивают эфиром порциями по 15 мл, каждый раз количественно перенося промывной эфир на колонку. После проникновения последней порции промывного эфира в слой адсорбента через колонку пропускают около 100 мл эфира. Объединенный эфирный элюат упаривают досуха на роторном испарителе, остаток продувают током азота, сушат при температуре 100-105 оС до постоянной массы, охлаждают и взвешивают.

Содержание смеси глицеридов насыщенных жирных кислот в субстанции в процентах (*X*) вычисляют по формуле:

$$X=\frac{m∙100}{а}$$

где: *m* – масса полученного сухого остатка, мг;

 *а* – навеска субстанции, мг.

**Хранение.** При температуре не выше 25 оС.