**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |  |
| --- | --- |
| **Мед натуральный** | **ФС** |
|  ***Mel naturale*** | **Вводится впервые** |

Настоящая фармакопейная статья распространяется на мед натуральный - продукт жизнедеятельности пчел *Apis cerana* Fabr. или *Apis mellifera* L., сем. пчелиные – *Apidae,* применяемый для производства лекарственных препаратов. Субстанция должна соответствовать требованиям ОФС «Фармацевтические субстанции животного происхождения» и нижеприведённым требованиям.

Содержит фруктозу от 30,0 до 43,0 %, глюкозу от 22,0 до 40,0 %, сахарозу от 0,1 до 10,0 %, туранозу от 0,5 до 3,0 %, мальтозу от 0,5 до 5,0 %; трегалозу от 0,5 до 2,5 %, арабинозу от 0,5 до 2,5 %, раффинозу от 0,5 до 2,5 %, мелецитозу от 0,5 до 4,0 %, мелибиозу от 0,5 до 2,5 % в пересчете на сухую субстанцию.

**Описание.** Вязкая жидкость от белого до темно-коричневого цвета с характерным запахом. При длительном хранении или охлаждении может кристаллизоваться.

**Растворимость**. Очень легко или легко растворим в воде.

**Подлинность**

**Высокоэффективная жидкостная хроматография.** Времена удерживания основных пиков на хроматограмме испытуемого раствора должны соответствовать временам удерживания основных пиков на хроматограмме раствора СО глюкозы и фруктозы, полученного для количественного определения.

\***Прозрачность раствора.** 0,45 % раствор субстанции должен быть прозрачным или выдерживать сравнение с эталоном I. В соответствии с требованиями ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей».

\***Цветность раствора.** 0,45 % раствор субстанции должен выдерживать сравнение с эталоном Y6 или BY6. В соответствии с требованиями ОФС «Степень окраски жидкостей».

**pH.** От 4,5 до 6,5 ( 10 % раствор). В соответствии с требованиями ОФС «Ионометрия» (метод 3).

**Электропроводность.** Не более 0,8 мСм·см-1 (20 % раствор). В соответствии с требованиями ОФС «Электропроводность».

**Родственные примеси.** Определение проводят методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

*Приготовление растворов*

*Подвижная фаза (ПФ*). Вода – ацетонитрил (80 : 20).

Срок годности раствора не более 1 мес при хранении в защищенном от света месте.

*Испытуемый раствор.* 40,0 мг (точная навеска) субстанции помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, растворяют в 7 мл воды, доводят объем раствора тем же растворителем до метки, перемешивают и фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм.

*Раствор стандартного образца (СО) 5-гидроксиметилфурфурола.* Около 25 мг (точная навеска) СО 5-гидроксиметилфурфурола (CAS 67-47-0) помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 25 мл воды, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают (0,5 мг/мл). 1,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 25 мл воды, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают (0,005 мг/мл). 5,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 20 мл воды, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают (0,0005 мг/мл).

*Раствор для проверки чувствительности хроматографической системы.* 1,0 мл раствора СО 5-гидроксиметилфурфурола (0,0005 мг/мл)помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой метки и перемешивают (0,000005 мг/мл).

*Условия хроматографирования*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка  | 250 мм × 4,6 мм, силикагель октадецилсилильный для хроматографии, 5мкм |
| Температура колонки, °С | 25 |
| Скорость потока, мл/мин | 1,0 |
| ДетекторДлина волны, нм | спектрофотометрический283 |
| Режим хроматографирования | изократический |
| Объем вводимой пробы, мкл | 20 |
| Время хроматографирования, мин | 10 |

Хроматографируют раствор для проверки чувствительности хроматографической системы, раствор СО 5-гидроксиметилфурфуролаи испытуемый раствор.

Время удерживания 5-гидроксиметилфурфурола – около 4,5 мин.

*Проверка пригодности хроматографической системы.* Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

на хроматограмме раствора СО 5-гидроксиметилфурфурола

- эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику 5-гидроксиметилфурфурола, должна быть не менее 1000 теоретических тарелок;

- относительное стандартное отклонение площади пика 5-гидроксиметилфурфурола должно быть не более 2,0 % (6 введений);

- фактор асимметрии пика 5-гидроксиметилфурфурола должен быть не более 2,0.

на хроматограмме раствора для проверки чувствительности хроматографической системы

- отношение сигнал/шум для пика 5-гидроксиметилфурфуроладолжно быть не менее 10.

Содержание 5-гидроксиметилфурфурола в препарате в процентах (*Х*) вычисляют по формуле:

$$X= \frac{S ∙ a\_{0} ∙1 ∙5∙P ∙1000 ∙100 }{S\_{0} ∙50 ∙100∙50∙100 ∙(100-W)}= \frac{S ∙ a\_{0} ∙P }{S\_{0} ∙50 ∙(100-W)},$$

где: *S* − площадь пика 5-гидроксиметилфурфурола на хроматограмме испытуемого раствора;

 *Sо* – площадь пика 5-гидроксиметилфурфурола на хроматограмме раствора СО 5-гидроксиметилфурфурола;

 *ао* − навеска СО 5-гидроксиметилфурфурола, г;

 *Р* – содержание основного вещества в СО 5-гидроксиметилфурфурола, %;

 *W* – содержание воды.

*Допустимое содержание примесей:*

- 5-гидроксиметилфурфурола не более 0,01 %.

**Вода.** Не более 20 %.

*Испытуемый образец*. 3,0 г субстанции помещают в стеклянную пробирку, плотно укупоривают резиновой пробкой и выдерживают на водяной бане при температуре не выше 50 °С до полного растворения кристаллов. Затем пробирку охлаждают до комнатной температуры, не открывая пробирку. Воду, сконденсировавшуюся на внутренней поверхности стенок пробирки, тщательно перемешивают с субстанцией. Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Рефрактометрия».

Содержания воды в субстанции определяют по таблице.

Таблица

Соотношения содержания воды в субстанции и показателя преломления

|  |  |
| --- | --- |
| **Содержание воды****(%, по массе)** | **Показатель преломления при 20 °С** |
| 15,0 | 1,4992 |
| 15,2 | 1,4987 |
| 15,4 | 1,4982 |
| 15,6 | 1,4976 |
| 15,8 | 1,4971 |
| 16,0 | 1,4966 |
| 16,2 | 1,4961 |
| 16,4 | 1,4956 |
| 16,6 | 1,4951 |
| 16,8 | 1,4946 |
| 17,0 | 1,4940 |
| 17,2 | 1,4935 |
| 17,4 | 1,4930 |
| 17,6 | 1,4925 |
| 17,8 | 1,4920 |
| 18,0 | 1,4915 |
| 18,2 | 1,4910 |
| 18,4 | 1,4905 |
| 18,6 | 1,4900 |
| 18,8 | 1,4895 |
| 19,0 | 1,4890 |
| 19,2 | 1,4885 |
| 19,4 | 1,4880 |
| 19,6 | 1,4875 |
| 19,8 | 1,4870 |
| 20,0 | 1,4865 |
| 20,2 | 1,4860 |
| 20,4 | 1,4855 |

**Показатель преломления.** Не менее 1,487 (при содержании воды 20 %). В соответствии с требованиями ОФС «Рефрактометрия». Описание испытуемого образца и оценка результатов приведены в разделе «Вода».

**Хлориды**. Не более 0,035 %. В соответствии с требованиями ОФС «Хлориды». Для определения используют 0,6 г субстанции.

**Сульфаты**. Не более 0,025 %. В соответствии с требованиями ОФС «Сульфаты». Для определения используют 0,4 г субстанции

**Оптическое вращение**. Не более + 6°. В соответствии с требованиями ОФС «Поляриметрия».

*Испытуемый раствор.* 20,0 г субстанции помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 50 мл воды на ультразвуковой бане, прибавляютаммиака раствора концентрированного 25 %, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. При необходимости обесцвечивают раствор активированным углем.

\***Биологический тест.** Субстанция считается активной, если продолжительность «тиопенталового сна» в опытной группе мышей сокращается не менее чем на 15 % по сравнению с продолжительностью сна в контрольной группе мышей.

*Приготовление растворов*

*Испытуемый раствор.* 45 мг (точная навеска) субстанции помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, растворяют в 8 мл воды для инъекций, доводят объем раствора тем же растворителем до метки, перемешивают и фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм.

*Раствор тиопентала натрия 0,2 %.* 0,02 г тиопентала натрия растворяют в 10,0 мл 0,9 % раствора натрия хлорида.

Раствор используют свежеприготовленным.

Испытания проводят на здоровых белых беспородных мышах одного пола, массой тела 20-21г, которые ранее не использовались в экспериментах. За 2 ч до взвешивания и отбора животных для проведения испытания у них отбирают корм и воду. Мышей взвешивают и делят на опытную и контрольную группы, по 10 особей в каждой.

Опытной группе мышей вводят внутривенно 0,2 мл испытуемого раствора на мышь; контрольной группе вводят внутривенно 0,2 мл 0,9 % раствора натрия хлорида на мышь. Через 2 мин после инъекции всем мышам обеих групп вводят внутривенно по 0,5 мл 0,2 % раствора тиопентала натрия. Практически сразу после введения тиопентала натрия животные принимают боковое положение и засыпают. Длительность сна регистрируют в минутах для каждой особи индивидуально, полученные величины усредняют для каждой группы.

Биологическую активность субстанции в процентах (А) вычисляют по формуле:

A $=\frac{\left(B-C\right) ∙100 }{B},$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где: | *A* | – | разница «тиопенталового сна» в контрольной и опытной группах, %; |
|  | *B* | – | средняя продолжительность «тиопенталового сна» мышей в контрольной группе, мин; |
|  | $$C$$ | – | средняя продолжительность «тиопенталового сна» мышей в опытной группе, мин. |

\***Пирогенность.** Субстанция должна быть апирогенной. В соответствии с требованиями ОФС «Пирогенность». Тест-доза – 2,3 мг субстанции в 0,5 мл воды для инъекций на 1 кг.

\***Аномальная токсичность**. Субстанция должна быть не токсичной. В соответствии с требованиями ОФС «Аномальная токсичность». Тест-доза – 2,3 мг субстанции в 0,5 мл воды для инъекций на мышь, внутривенно. Срок наблюдения 48 ч.

**Тяжелые металлы и мышьяк.** Свинца не более 1,0 мг/кг, кадмия не более 0,05 мг/кг, ртути не более 0,01 мг/кг, мышьяка не более 0,5 мг/кг. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

**Радионуклиды.** В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

**Остаточные количества пестицидов**. Гексахлорциклогексана и его изомеров (в сумме) не более 0,005 мг/кг, ДДТ и его метаболитов (в сумме) не более 0,005 мг/кг. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

**Микробиологическая чистота**.В соответствии стребованиямиОФС «Микробиологическая чистота».

**Количественное определение**. Определение проводят методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

*Приготовление растворов*

*Подвижная фаза (ПФ).* Ацетонитрил – вода (80 : 20).

*Испытуемый раствор.* 5,0 г (точная навеска) субстанции помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют в 60 мл воды и растворяют на ультразвуковой бане. К полученному раствору добавляют 25,0 мл метанола для жидкостной хроматографии, доводят объём раствора водой до метки, перемешивают и фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм.

Срок годности раствора не более 1 мес при хранении при температуре не выше 4 оС, защищенном от света месте.

*Раствор стандартных образцов (СО) сахаров*. Около 2,0 г (точная навеска) СО фруктозы, около 1,5 г (точная навеска) СО глюкозы, около 0,25 г (точная навеска) СО сахарозы, около 0,15 г (точная навеска) СО туранозы, около 0,15 г (точная навеска) СО мальтозы, около 0,15 г (точная навеска) СО трегалозы, около 0,15 г (точная навеска) СО арабинозы, около 0,15 г (точная навеска) СО раффинозы, около 0,15 г (точная навеска) СО мелецитозы, около 0,15 г (точная навеска) СО мелибиозы помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 25 мл метанола для жидкостной хроматографии, доводят объем раствора тем же растворителем до метки, перемешивают и фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм.

Срок годности раствора не более 1 мес при хранении при температуре не выше 4 оС, защищенном от света месте.

Условия хроматографирования

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка  | 250 × 4,6 мм, силикагель октадецилсилильный эндкепированный для хроматографии, 5 мкм |
| Предколонка | 4 мм × 3 мм, силикагель октадецилсилильный для хроматографии, 5 мкм |
| Температура колонки, °С | 30 |
| Скорость потока, мл/мин | 1,3 |
| Детектор | рефрактометрический |
| Режим хроматографирования | изократический |
| Объем вводимой пробы, мкл | 20 |
| Время хроматографирования, мин | 25 |

Хроматографируют испытуемый раствор и раствор СО сахаров.

Относительные времена удерживания пиков: фруктозы - 1 (около 5,2 мин); глюкозы - около 1,2; сахарозы - около 1,6; туранозы - около 1,8; мальтозы - около 2,1; трегалозы - около 2,4; арабинозы - около 2,7; раффинозы - около 3,0; мелецитозы - около 3,5; мелебиозы - около 4,0.

*Проверка пригодности хроматографической системы.* Хроматографическая система считается пригодной, если для хроматограммы раствора СО сахаров выполняются следующие условия:

- эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пикам глюкозы и фруктозы, должна быть не менее 1000 теоретических тарелок;

- фактор асимметрии пиков глюкозы и фруктозы должен быть не более 2,0;

- разрешение между пиками глюкозы и фруктозы должно быть не менее 1,5;

- относительное стандартное отклонение площадей пиков глюкозы и фруктозы должно быть не более 2,0 % (6 введений).

Содержание каждого компонента (фруктоза, глюкоза, сахароза, тураноза, мальтоза; трегалоза, арабиноза, раффиноза, мелецитоза, мелибиоза) в пересчете на сухую субстанцию в процентах (*Хi*) вычисляют по формуле:

$$X\_{i}=\frac{S\_{i} ∙a\_{oi}∙100∙P\_{i}∙100 ∙100}{S\_{oi}∙a∙100∙100 ∙(100-W)}=\frac{S\_{i} ∙a\_{oi}∙P\_{i}∙100 }{S\_{oi}∙a∙(100-W)},$$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где: | *Si* | – | площадь пика каждого компонента (фруктоза, глюкоза, сахароза, тураноза, мальтоза; трегалоза, арабиноза, раффиноза, мелецитоза, мелибиоза) на хроматограмме испытуемого раствора; |
|  | $$S\_{oi}$$ | – | площадь пика каждого компонента (фруктоза, глюкоза, сахароза, тураноза, мальтоза; трегалоза, арабиноза, раффиноза, мелецитоза, мелибиоза) на хроматограмме раствора СО сахаров; |
|  | *аоi* | – | навеска СО сахара (фруктоза, глюкоза, сахароза, тураноза, мальтоза; трегалоза, арабиноза, раффиноза, мелецитоза, мелибиоза), г; |
|  | *а* | – | навеска субстанции, г; |
|  | *Рi* | – | содержание основного вещества в CO каждого сахара (фруктоза, глюкоза, сахароза, тураноза, мальтоза; трегалоза, арабиноза, раффиноза, мелецитоза, мелибиоза), %. |

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

\*Проводят для субстанции, предназначенной для производства лекарственных форм для парентерального применения.