**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |  |
| --- | --- |
| **Аскорбиновая кислота + Колекальциферол + Ретинола пальмитат, капли для приема внутрь**  ***Acidum ascorbicum + Colecalciferolum + Retinoli palmitas, guttae ad usum internum*** | **ФС**  **Вводится впервые** |

Настоящая фармакопейная статья распространяется на лекарственный препарат Аскорбиновая кислота + Колекальциферол + Ретинола пальмитат, капли для приема внутрь.

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

Препарат содержит от заявленного количества:

̶ аскорбиновой кислоты C6H8O6 – не менее 90 % и не более 150 %;

̶ ̶ колекальциферола C27H44O –не менее 90 % и не более 165 %;

̶ ретинола пальмитат С36Н60О2 –не менее 90 % и не более 165 %.

Описание. Содержание раздела приводится в соответствии с ОФС «Лекарственные формы», ОФС «Капли».

**Подлинность**

ВЭЖХ. Определение проводят методом ВЭЖХ по разделу «Количественное определение» в соответствии с ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография».

Время удерживания основных пиков на хроматограммах испытуемых растворов *ретинола пальмитат*, колекальциферола, *аскорбиновой кислоты,* должно соответствовать времени удерживания пиков соответствующих компонентов на хроматограммах соответствующих растворов стандартного образца или стандартных растворов.

**pH.** От 5,8 до 6,2. В соответствии с требованиями ОФС «Ионометрия», метод 3.

**Масса (объем) содержимого упаковки.** В соответствии с требованиями ОФС «Масса (объем) содержимого упаковки».

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

**Количественное определение**

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

⃰Витамин А обладает чувствительностью к свету, поэтому необходимо использовать светозащитную лабораторную посуду (посуду темного стекла и светозащитные пробирки для ВЭЖХ), а так же держать пробирки для ВЭЖХ в защищенном от света месте.

* Подвижная фаза А. 2-пропанол⎯ацетонитрил ⎯ 10:90.
* Подвижная фаза В. Вода очищенная дегазированная.

Испытуемый раствор. В качестве испытуемого раствора используют испытуемый образец. Срок годности испытуемого раствора при температуре 15-25 °С в защищенном от света месте - не более 1 сут.

* ⃰Флакон необходимо взболтать перед отбором пробы на анализ.

Раствор стандартного образца ретинола пальмитата. Около 55,0 мг (точная навеска) стандартного образца ретинола пальмитата (эквивалентно 30,0 мг ретинола) помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в этаноле и доводят объем раствора этанолом до метки, перемешивают (концентрация раствора ретинола пальмитата около 0,55 мг/мл соответствует около 0,3 мг/мл ретинола). Срок годности раствора в защищенном от света месте при температуре 15-25 °С - не более 1 сут

Раствор для определения пригодности хроматографической системы.

Приготовление аналогично приготовлению стандартного раствора.

Срок годности раствора при температуре 15-25 °С в защищенном от света месте - не более 1 сут.

*Раствор сравнения.* Этанол

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 250 х 4,6 мм силикагель октадецилсилильный для хроматографии, 5 мкм; |
| Температура колонки | 30 °С; |
| Детектор | спектрофотометрический:  327 нм; |
| Объем пробы | 20 мкл; |
| Скорость потока | 2,0 мл/мин. |

Время хроматографирования: 60 мин

Время удерживания ретинола пальмитата - около 40,6 мин.

Программа градиентного элюирования:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Шаг | Время, мин | Подвижная фаза А (%) | Подвижная фаза В (%) |
| 1 | 0 | 80 | 20 |
| 2 | 25 | 100 | 0 |
| 3 | 50 | 100 | 0 |
| 4 | 51 | 80 | 20 |
| 5 | 60 | 80 | 20 |

Проверка пригодности хроматографической системы.

На хроматограмме раствора:

̶ *эффективность хроматографической колонки (N)*, рассчитанная по пику ретинола пальмитата, - не менее 4000 теоретических тарелок;

̶ *фактор асимметрии для пика (AS)* ретинола пальмитата на хроматограмме стандартного раствора должен быть в диапазоне от 0,8 до 1,5;

̶ *относительное стандартное отклонение* площадей пиков ретинола пальмитата для пяти последовательных инъекций стандартного раствора - не более 2,0%.

Раздельно вводят в жидкостной хроматограф раствор сравнения, стандартный раствор (пять раз), раствор для определения пригодности хроматографической системы и испытуемый раствор, регистрируют хроматограммы и определяют площади основного пика. Просматривают хроматограммы испытуемого и стандартного растворов, игнорируя пики из раствора сравнения. Идентифицируют пик ретинола пальмитата на хроматограммах испытуемого и стандартного растворов путем сравнения времен удерживания.

- *Время удерживания (RT)* ретинола пальмитата на хроматограмме испытуемого раствора должно соответствовать времени удерживания ретинола пальмитата на хроматограмме стандартного раствора (RT ретинола пальмитата на хроматограмме испытуемого раствора

* RT ретинола пальмитата на хроматограмме стандартного раствора ± 5%).

Содержание ретинола пальмитата С36Н60О2 в пересчете на ретинол С36Н60О в испытуемом образце в процентах от заявленного количества (X) вычисляют по формуле:

Х=

где: S1 - площадь пика ретинола пальмитата на хроматограмме испытуемого раствора;

So - площадь пика ретинола пальмитата на хроматограмме стандартного раствора;

ао - навеска стандартного образца ретинола пальмитата, мг;

Р - содержание ретинола пальмитата в стандартном образце, %;

L - заявленное количество ретинола пальмитата в одной таблетке, мг.

1,832- фактор пересчета ретинола пальмитата в ретинол.

Альтернативно для определения содержания ретинола пальмитата в пересчете на ретинол в испытуемом образце в микрограммах в миллилитре (X) вычисляют по формуле:

Х=

где: S1 - площадь пика ретинола пальмитата на хроматограмме испытуемого

раствора;

So - площадь пика ретинола пальмитата на хроматограмме

стандартного раствора;

ао - навеска стандартного образца ретинола пальмитата, мг;

Р - содержание ретинола пальмитата в стандартном образце, мг/мг;

100 - фактор разведения;

L - заявленное количество ретинола пальмитата в одной таблетке, мг;

1,832 - фактор пересчета ретинола пальмитата в ретинол.

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

⃰Обладает чувствительностью к свету, поэтому необходимо использовать светозащитную лабораторную посуду (посуду темного стекла или посуду, обернутую алюминиевой фольгой, светозащитные пробирки для ВЭЖХ) и хранить пробирки для ВЭЖХ в защищенном от света месте.

*Натрия карбоната раствор 5%.* Растворяют около 5 г натрия карбоната безводного в 100 мл воды, обрабатывая ультразвуком при температуре 15-25 °С, перемешивают и дегазируют.

*Разбавитель.* Вода⎯ацетонитрил 12:88.

*Раствор для экстрагирования*. Ацетон⎯метиленхлорид 20:80, прибавляют 0,1 г бутилгидрокситолуола и перемешивают.

Подвижная фаза. *Условия элюирования для стандартных растворов*: изократический режим элюирования смесью вода⎯ацетонитрил 12:88. Компоненты подаются раздельно (время уравновешивания системы - 20 мин);

*Условия элюирования для испытуемого раствора*: градиентный режим элюирования приведен в таблице ниже (время уравновешивания системы 45 мин).

⃰Ацетонитрил и вода предварительно дегазируются.

Испытуемый раствор. Точную навеску испытуемого препарата, эквивалентную по содержанию 250 мкг колекальциферола, переносят в коническую колбу вместимостью 250 мл, прибавляют 25 мл натрия карбоната раствора 5% и перемешивают с помощью магнитной мешалки в течение10 мин. Прибавляют 80 мл раствора для экстракции и продолжают перемешивание в течение еще 10 мин.

Переносят содержимое колбы в делительную воронку, ополаскивают колбу раствором для экстракции и прибавляют его к содержимому воронки. Оставляют воронку для разделения слоев, затем фильтруют нижний слой (органическую фазу) через ватный тампон со слоем безводного сульфата натрия в круглодонную колбу вместимостью 250 мл.

Прибавляют в делительную воронку 40 мл раствора для экстракции, энергично встряхивают воронку в течение около 1 минуты и оставляют для разделения слоев, затем фильтруют нижний слой (органическую фазу) через ватный тампон со слоем безводного сульфата натрия в ту же круглодонную колбу вместимостью 250 мл.

Повторяют процедуру экстракции раствором для экстракции еще два раза.

Фильтраты, собранные в круглодонной колбе, выпаривают с помощью ротационного испарителя при температуре не более 50 °С.

Переносят полученный масляный остаток в мерную колбу вместимостью 5 мл, дважды ополаскивают круглодонную колбу аликвотами разбавителя по 1,5 мл и доводят разбавителем объем до метки, перемешивают (концентрация колекальциферола - около 0,05 мг/мл).

Содержимое колбы фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм.

Срок годности испытуемого раствора в защищенном от света месте при температуре 5 °С - 1 сут. Раствор рекомендуется использовать свежеприготовленным.

Флакон необходимо взболтать перед отбором пробы на анализ.

Растворы стандартных образцов *колекальциферола*

Исходный раствор стандартного образца *колекальциферола*. Около 25,0 мг (точная навеска) стандартного образца колекальциферола (предварительно выдержанного в помещении до температуры 15-25 °С), помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл. Прибавляют 25 мл разбавителя, взбалтывают и обрабатывают ультразвуком при температуре 15-25 °С до полного растворения, доводят разбавителем до метки и перемешивают (концентрация колекальциферола - около 0,5 мг/мл).

Раствор следует хранить в ледяной воде. Срок годности раствора - 24 ч.

Раствор стандартного образца *колекальциферола*. В мерную колбу вместимостью 20 мл помещают 2,0 мл исходного раствора стандартного образца, доводят разбавителем до метки, перемешивают (концентрация колекальциферола – около 0,05 мг/мл).

Срок годности стандартного раствора при температуре 15-25 °С в защищенном от света месте - 1 сут.

Раствор для оценки разделения пре-колекальциферола и колекалъциферола. В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 5,0 мл исходного раствора стандартного образца, прибавляют 10,0 мг бутилгидрокситолуола, нагревают на водяной бане при температуре 90 °С в течение 45 мин, предохраняя от действия света, для образования изомера (пре- колекальциферола), охлаждают до температуры 15-25 °С, доводят разбавителем до метки и перемешивают.

Срок годности раствора при температуре 15-25 °С в защищенном от света месте - 1 сут.

Раствор для определения пригодности хроматографической системы. Приготовление аналогично приготовлению раствора стандартного образца.

Срок годности раствора при температуре 15-25 °С в защищенном от света месте - не более 1 сут.

Раствор сравнения. Разбавитель.

Хроматографические условия.

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 250 х 4,6 мм силикагель октилсилильный для хроматографии, 5 мкм; |
| Температура колонки | 30 °С ; |
| Детектор | спектрофотометрический:  265 нм ; |
| Объем пробы | 80 мкл; |
| Скорость потока | 2,0 мл/мин. |

Время хроматографирования: 55 мин.

Программа градиентного элюирования:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Шаг | Время, мин | Ацетонитрил, % | Вода, % |
| 1 | 0 | 88 | 12 |
| 2 | 25 | 88 | 12 |
| 3 | 35 | 100 | 0 |
| 4 | 45 | 100 | 0 |
| 5 | 45,1 | 88 | 12 |
| 6 | 55 | 88 | 12 |

*Пригодность хроматографической системы*

.На хроматограмме раствора стандартного образца колекальциферола:

̶ *эффективность хроматографической колонки (N)* , рассчитанная по пику колекальциферола, - не менее 5000 теоретических тарелок;

̶ *фактор асимметрии* пика (*AS*) колекальциферола на хроматограмме стандартного раствора должен быть в диапазоне от 0,8 до 1,5;

̶ *относительное стандартное отклонение* площадей пиков колекальциферола для пяти последовательных инъекций стандартного раствора - не более 2,0%;

На хроматограмме раствора для проверки разделительной способности хроматографической системы:

̶ *разрешение (Rs) между пиками* колекальциферола и пре-колекальциферола не менее 1,0.

Раздельно вводят в жидкостной хроматограф раствор сравнения, раствор для оценки разделения, стандартный раствор (пять раз), раствор для определения пригодности хроматографической системы и испытуемый раствор, регистрируют хроматограммы и определяют площади основного пика.

Идентифицируют пик колекальциферола, сравнивая времена удерживания пиков на хроматограммах испытуемого и стандартного растворов.

*- Время удерживания (RT)* колекальциферола на хроматограмме испытуемого раствора должно соответствовать времени удерживания колекальциферола на хроматограмме стандартного раствора (RT колекальциферола на хроматограмме испытуемого раствора равно RT колекальциферола на хроматограмме стандартного раствора ± 5%).

Идентифицируют пик пре-колекальциферола по относительному времени удерживания (RRT), сравнивая с временем удерживания пика колекальциферола.

Не учитывают интеграцию до 9 минут или до пиков с RRT 0,64 и после 17 минут или до пиков с RRT 1,22.

Типичные времена удерживания колекальциферола и пре-колекальциферола указаны в таблице ниже.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Вещество | RT (мин) | RRT |
| колекальциферол | около 13,9 | около 1,00 |
| пре-колекальциферол | около 14,7 | около 1,06 |

Содержание колекальциферола C27H44O в испытуемом образце в процентах от заявленного количества (X) вычисляют по формуле:

X=

где: S1 - площадь пика колекальциферола на хроматограмме

испытуемого раствора;

S2 - площадь пика пре-колекальциферола на хроматограмме испытуемого раствора;

S0- площадь пика колекальциферола на хроматограмме стандартного раствора;

S3- площадь пика пре-колекальциферола на хроматограмме стандартного раствора;

f- 1,8 (фактор пересчета колекальциферола в пре-колекальциферол);

ао - навеска стандартного образца колекальциферола, мг;

Р - содержание колекальциферола в стандартном образце, %;

D - плотность испытуемого образца, г/мл;

а - навеска испытуемого образца, мг;

100 - фактор разведения.

Аскорбиновая кислота. Определение проводят методом ВЭЖХ (ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография»).

⃰Аскорбиновая кислота обладает чувствительностью к свету, поэтому следует использовать светозащитную лабораторную посуду (посуду темного стекла и пробирки для ВЭЖХ), а так же держать пробирки для ВЭЖХ в защищенном от света месте.

Подвижная фаза А. Раствор тетрабутиламмония гидроксида (pH 6,0).

Прибавляют 2 мл тетрабутиламмония гидроксида раствора 40% к 1000 мл воды и доводят pH до 6,0 с помощью фосфорной кислоты концентрированной, перемешивают и дегазируют.

Подвижная фаза В. Метанол.

Изократический режим элюирования подвижными фазами А и В в соотношении 90:10 компоненты подаются раздельно (время уравновешивания системы - до получения стабильной базовой линии).

Испытуемый раствор. Точную навеску испытуемого препарата эквивалентную по содержанию 70,0 мг аскорбиновой кислоты, помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют около 50 воды, осторожно взбалтывают вручную и доводят водой по метки (концентрация аскорбиновой кислоты - около 0,7 мг/мл).

Срок годности испытуемого раствора при температуре 5 °С в защищенном от света месте - 1 сут. Раствор рекомендуется использовать свежеприготовленным.

Флакон необходимо взболтать перед отбором пробы на анализ.

Во избежание образования устойчивой пены полученный испытуемый раствор также допускается взболтать (перемешать) после доведения объема до метки.

Раствор стандартного образца *аскорбиновой кислоты*. Около 70,0 мг (точная навеска) стандартного образца аскорбиновой кислоты помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют около 50 мл воды, взбалтывают и обрабатывают ультразвуком при температуре 15-25 °С до полного растворения, доводят водой до метки, перемешивают (концентрация аскорбиновой кислоты - около 0,7 мг/мл). Срок годности стандартного раствора при температуре 5 °С в защищенном от света месте 1 сут. Раствор рекомендуется использовать свежеприготовленным.

Раствор для определения пригодности хроматографической системы.

Приготовление аналогично приготовлению стандартного раствора.

Срок годности раствора при температуре 5 °С в защищенном от света месте - 1 сут. Раствор рекомендуется использовать свежеприготовленным.

Раствор сравнения. Вода очищенная.

Хроматографические условия.

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 250 х 4,6 мм силикагель октадецилсилильный для хроматографии, 5 мкм; |
| Температура колонки | 25 °С; |
| Детектор | спектрофотометрический:  265нм; |
| Объем пробы | 20 мкл; |
| Скорость потока | 10,0 мкл/мин или 5 мкл. |

Время хроматографирования: 40 мин.

\*Объем вводимой пробы (10 мкл) может быть уменьшен до 5 мкл, если пик аскорбиновой кислоты выходит за допустимые пределы диапазона. Уменьшение объема пробы считается допустимым, поскольку в процессе валидации методики ее робастность подтверждена для объема вводимой пробы от 5 мкл до 15 мкл

Проверка пригодности хроматографической системы.

На храматограмме раствора стандартного образца аскорбиновой кислоты:

* *эффективность хроматографической колонки (N)*, рассчитанная по пику аскорбиновой кислоты, - не менее 4000 теоретических тарелок;
* *фактор асимметрии для пика* (*AS*) аскорбиновой кислоты на хроматограмме стандартного раствора должен быть в диапазоне от 0,8 до 1,5;
* *относительное стандартное отклонение* площадей пиков аскорбиновой кислоты для пяти последовательных инъекций стандартного раствора - не более 2,0%.

Раздельно вводят в жидкостной хроматограф раствор сравнения, стандартный раствор (пять раз), раствор для определения пригодности хроматографической системы и испытуемый раствор, регистрируют хроматограммы и определяют площади основного пика.

Идентифицируют пик аскорбиновой кислоты на хроматограммах испытуемого и стандартного растворов путем сравнения времен удерживания.

Время удерживания (RT) аскорбиновой кислоты на хроматограмме испытуемого раствора должно соответствовать времени удерживания аскорбиновой кислоты на хроматограмме стандартного раствора (RT аскорбиновой кислоты на хроматограмме испытуемого раствора равно RT аскорбиновой кислоты на хроматограмме стандартного раствора ± 5%). Время удерживания аскорбиновой кислоты - около 7,1 мин.

Содержание аскорбиновой кислоты C6H8O6 в испытуемом препарате в процентах от заявленного количества (X) вычисляют по формуле:

Х=,

где:S1 - площадь пика аскорбиновой кислоты на хроматограмме

испытуемого раствора;

So - площадь пика аскорбиновой кислоты на хроматограмме

стандартного раствора;

ао - навеска стандартного образца аскорбиновой кислоты, мг;

Р - содержание аскорбиновой кислоты в стандартном образце, %;

а – навеска испытуемого образца, г;

L - заявленное количество аскорбиновой кислоты в одном миллилитре

препарата, мг;

D - плотность испытуемого образца (г/мл).

**Хранение**. Содержание раздела приводится в соответствии с ОФС «Хранение лекарственных средств».