**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |
| --- |
| [Ячейка: 1 интервал, ширина линии 16,5 см. Строка ниже: точно 2] |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Определение состава жирных кислот в маслах жирных растительных и жирах** |  | **ОФС.1.5.3.0017** |
|  |  | **Вводится впервые** |

|  |
| --- |
| [ |

Метод определения состава жирных кислот в маслах жирных растительных и жирах проводят методом газовой хроматографии (ОФС «Газовая хроматография»).

**Методика 1**

Методика неприменима для масел, содержащих глицериды жирных

кислот с эпокси-, гидроэпокси-, гидроперокси-, циклопропиловыми или циклопропениловыми группами, а также для масел, в составе которых большая часть жирных кислот имеет длину цепи менее восьми атомов углерода, или для масел с кислотным числом более 2,0.

Метиловые эфиры жирных кислот могут быть получены следующими способами, если в фармакопейной статье не приведены иные условия:

*1.* В колбу вместимостью 50 мл помещают 0,1 – 0,15 мл тщательно перемешенного испытуемого образца, добавляют 1 мл метанола и 0,05 – 0,1 мл ацетилхлорида. Смесь аккуратно перемешивают и нагревают на водяной бане с обратным холодильником в течение 1 ч. Избыток метанола отгоняют. К остатку прибавляют 0,2 мл гексана (гептана или другого растворителя с соответствующей полярностью) и перемешивают.

*2.* В колбу вместимостью 50 мл, снабжённую пришлифованным обратным холодильником, помещают 0,1 г тщательно перемешенного испытуемого образца, приливают 10 мл метанола. К полученной смеси прибавляют 0,28 г калия гидроксида и нагревают с обратным холодильником на песчаной бане при температуре 105-110 ºС в течение 1 часа. Смесь охлаждают до комнатной температуры, приливают по каплям 0,5 мл диметилсульфата, нагревают с обратным холодильником на песчаной бане при температуре 105-110 ºС в течение 30 мин и приливают ещё 0,2 мл диметилсульфата. Из полученного раствора отгоняют метанол до объёма 2,5 мл. Смесь охлаждают до комнатной температуры, приливают 20 мл воды, переносят в делительную воронку, добавляют 20 мл гексана (гептана или другого растворителя с соответствующей полярностью) и интенсивно встряхивают. Верхний слой отделяют и фильтруют через беззольный фильтр, содержащий 1 г натрия сульфата безводного.

*Раствор сравнения А.* Готовят 0,5 г смеси веществ, применяемых для калибровки (калибровочной смеси), состава приведённого в таблицах 1, 2 или 3, в соответствии с указаниями в фармакопейной статье. Если в фармакопейной статье не указан определённый раствор, готовят смесь состава, приведённого в таблице 1. Смесь растворяют в гексане (гептане или другом растворителе с соответствующей полярностью) и доводят объём раствора тем же растворителем до 50 мл.

*Раствор сравнения Б.* Доводят 1,0 мл раствора сравнения A гептаном до 10 мл.

*Раствор сравнения В.* Готовят 0,5 г смеси метиловых эфиров жирных кислот, которые по составу соответствуют смеси жирных кислот, указанных в фармакопейной статье на испытуемое вещество. Смесь растворяют в гексане (гептане или другом растворителе с соответствующей полярностью) и доводят объём раствора тем же растворителем до 50 мл. Допускается также использование готовых смесей метиловых эфиров жирных кислот.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| *Условия хроматографирования* | | |
| Колонка | Кварцевая капиллярная длиной 10-30, диаметром от 0,2 до 0,8 мм, с неподвижной фазой полиэтиленгликоль 20 М (макрогол 20000), толщиной от 0,1 до 0,5 мкм или другая неподвижная фаза | |
| Детектор | пламенно-ионизационный | |
| Газ-носитель | Гелий, водород или азот для хроматографии | |
| Деление потока | 1:100 или менее в зависимости от внутреннего диаметра применяемой колонки (например, в случае использования колонки с внутренним диаметром 0,32 мм деление потока должно составлять 1:50) | |
| Скорость потока, мл/мин | 1,3 (для колонки с внутренним диаметром 0,32 мм) | |
| Объём пробы, мкл | 1 | |
| Температура | Колонка | 160-200 °С |
| Инжектор | 250 °С |
| Детектор | 250 °С |

Если требуется линейный градиент температуры, температуру колонки увеличивают, например, со скоростью 3 ºС/мин от 170 до 230 ºС.

*Пригодности хроматографической системы*. Хроматографическая система считается пригодной, если при использовании смеси веществ, используемых для калибровки, приведенных в таблице 1 или таблице 2, выполняются следующие условия:

- *разрешение (RS)* между пиками метилолеата и метилстеарата на хроматограмме раствора сравнения А должно быть не менее 1,8;

- *отношение сигнал/шум (S/N)* для пика метилмиристата на хроматограмме раствора сравнения Б должно быть не менее 5;

- *эффективность хроматографической колонки (N),* рассчитанная по пику метилстеарата на хроматограмме раствора сравнения А должна быть не менее 30000 теоретических тарелок.

Таблица 1 – Смесь веществ, применяемых для калибровки (для газовой хроматографии с капиллярной колонкой и системой с делением потока)

|  |  |
| --- | --- |
| **Смесь веществ** | **Состав (в процентах м/м)** |
| Метиллаурат | 5 |
| Метилмиристат | 5 |
| Метилпальмитат | 10 |
| Метилстеарат | 20 |
| Метиларахидат | 40 |
| Метилолеат | 20 |

Таблица 2 – Смесь веществ, применяемых для калибровки (для газовой хроматографии с капиллярной колонкой и системой с делением потока)

|  |  |
| --- | --- |
| **Смесь веществ** | **Состав (в процентах м/м)** |
| Метимиристат | 5 |
| Метилпальмитат | 10 |
| Метилстеарат | 15 |
| Метиларахидат | 20 |
| Метилолеат | 20 |
| Метилэйкозеноат | 10 |
| Метилбехенат | 10 |
| Метиллигноцерат | 10 |

Примечание − при выполнении качественного анализа с использованием калибровочных кривых в калибровочную смесь рекомендуется добавлять компонент испытуемого раствора с максимальным числом атомов углерода в цепи.

Хроматографическая система считается пригодной, если при использовании смеси веществ, применяемых для калибровки, приведённых в таблице 3 выполняются следующие условия:

- *разрешение (RS)* между пиками метилкаприлата и метилдеканоата на хроматограмме раствора сравнения А должно быть не менее 4,0;

- *отношение сигнал/шум (S/N)* для пика метилкапроата на хроматограмме раствора сравнения Б должно быть не менее 5;

- *эффективность хроматографической колонки (N),* рассчитанная по пику метилдеканоата на хроматограмме раствора сравнения А должна быть не менее 15000 теоретических тарелок.

Таблица 3 – Смесь веществ, применяемых для калибровки (для газовой хроматографии с капиллярной колонкой и системой с делением потока)

|  |  |
| --- | --- |
| **Смесь веществ** | **Состав (в процентах м/м)** |
| Метилкапроат | 10 |
| Метилкаприлат | 10 |
| Метилдеканоат | 20 |
| Метиллаурат | 20 |
| Метилмиристат | 40 |

Примечание − при выполнении качественного анализа с использованием калибровочных кривых в калибровочную смесь рекомендуется добавлять компонент испытуемого раствора с максимальным числом атомов углерода в цепи.

Следует избегать условий хроматографирования, которые могут дать неразделённые пики (наличие компонентов с небольшим различием между временами удерживания, например, линоленовая и арахидоновая кислоты).

***Качественный анализ*.** Идентифицируют пики на хроматограмме раствора сравнения В (изотермические условия хроматографирования или линейный градиент температуры).

При использовании изотермических условий хроматографирования пики могут быть также идентифицированы построением калибровочных кривых с использованием хроматограммы раствора сравнения А и данных таблиц 1, 2 или 3.

На хроматограмме раствора сравнения А измеряют приведённое время удерживания (tʹR) каждого пика.

tʹR  – разница между временем удерживания пика растворителя и временем удерживания несорбирующегося (в условиях определения) вещества.

Строят график линейной зависимости:

Lg (tʹR) = f (эквивалент числа атомов углерода в цепи).

Логарифмы tʹR ненасыщенных жирных кислот расположены на этой линии в точках, соответствующих не целым значениям «эквивалента числа атомов углерода в цепи». Эквивалент числа атомов углерода в цепи представляет собой длину теоретической цепи насыщенной жирной кислоты, которая должна была иметь такое же tʹR , как идентифицируемая жирная кислота. Например, у линолевой кислоты такое же tʹR , как у теоретической насыщенной жирной кислоты, имеющей 18,8 атомов углерода.

Идентификацию пиков на хроматограмме испытуемого раствора проводят по прямой линии и уменьшающимся временам удерживания.

Эквиваленты числа атомов углерода в цепи представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Эквиваленты числа атомов углерода в цепи (значения рассчитаны с использованием калибровочных кривых и приведены в качестве примера для колонки с макроголом 20 000)

|  |  |
| --- | --- |
| **Жирная кислота** | **Эквивалент числа атомов углерода в цепи** |
| Капроновая кислота | 6,0 |
| Каприловая кислота | 8,0 |
| Каприновая кислота | 10,0 |
| Лауриновая кислота | 12,0 |
| Миристиновая кислота | 14,0 |
| Пальмитиновая кислота | 16,0 |
| Пальмитолеиновая кислота | 16,3 |
| Маргариновая кислота | 17,0 |
| Стеариновая кислота | 18,0 |
| Олеиновая кислота | 18,3 |
| Линолевая кислота | 18,8 |
| Гамма-линоленовая кислота | 19,0 |
| Альфа-линоленовая кислота | 19,2 |
| Арахиновая кислота | 20,0 |
| 11-Эйкозеиновая кислота  (гондоиновая кислота) | 20,2 |
| Арахидоновая кислота | 21,2 |
| Бегеновая кислота | 22,0 |
| Эруковая кислота | 22,2 |
| 12-Оксостеариновая кислота | 22,7 |
| Рицинолевая кислота | 23,9 |
| 12-Гидроксистеариновая кислота | 23,9 |
| Лигноцериновая кислота | 24,0 |
| Нервоновая кислота | 24,2 |

***Количественный анализ*.** Используют метод внутренней нормализации. Не учитывают пики, площадь которых составляет менее 0,05 % от суммы площадей всех пиков.

В определённых случаях, например, при наличии жирных кислот с 12 или менее атомами углерода, в фармакопейной статье должен быть указан поправочный коэффициент для преобразования площадей пиков в проценты (м/м).

Содержание олеиновой кислоты представляет собой сумму олеиновой кислоты (18:1 n-9) и цис-вакциновой кислоты (18:1 n-7).

**Методика 2**

Методика неприменима для масел, содержащих глицериды жирных

кислот с эпокси-, гидроэпокси-, гидроперокси-, циклопропиловыми и циклопропениловыми группами или для масел с кислотным числом более 2,0.

*Испытуемый раствор.* В центрифужную пробирку с завинчивающейся крышкой помещают 0,1 г (точная навеска) испытуемого образца, растворяют в смеси 1 мл гептана (гексана или другом растворителе с соответствующей полярностью) с 1 мл диметилкарбоната, энергично перемешивают и нагревают до температуры 50±5 ºС. Прибавляют к ещё тёплому раствору 1 мл натрия раствора 1,2 % в метаноле и энергично перемешивают в течение 5 мин, прибавляют 3 мл воды и энергично перемешивают в течение 30  с. Смесь центрифугируют 15 мин со скоростью 1500 об/мин. Надосадочную жидкость используют в качестве испытуемого раствора.

*Растворы сравнения и анализ данных.* Если в фармакопейной статье нет других указаний, поступают, как указано в методике 1.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| *Условия хроматографирования* | | | |
| Колонка | Кварцевая капиллярная 30 м × 0,25 мм, макрогол 20000, 025 мкм | | |
| Детектор | пламенно-ионизационный | | |
| Газ-носитель | гелий для хроматографии | | |
| Деление потока | 1:100 | | |
| Скорость потока, мл/мин | 0,9 | | |
| Объём пробы, мкл | 1 | | |
| Температура | Колонка | 0–15 мин | 100 |
|  | 15–36 мин | 100 → 225 °С |
|  | 36–61 мин | 225 °С |
| Инжектор | | 250 °С |
| Детектор | | 250 °С |

**Методика 3**

Методика неприменима для масел, содержащих глицериды жирных

кислот с эпокси-, гидроэпокси-, гидроперокси-, альдегидными, кетоновыми, циклопропиловыми и циклопропениловыми группами и сопряженными полиненасыщенными и ацетиленовыми соединениями из-за частичного или полного разрушения этих групп.

*Испытуемый раствор.* В коническую колбу вместимостью 25 мл помещают 0,1 г испытуемого образца, растворяют в 2 мл натрия гидроксида раствора в метаноле 2 % и кипятят с обратным холодильником в течение 30 мин. Прибавляют через холодильник 2,0 мл бора фторида в метаноле 14 % и кипятят в течение 30 мин, прибавляют через холодильник 4,0 мл гептана и кипятят в течение 5 мин. Смесь охлаждают, прибавляют 10,0 мл натрия хлорида насыщенного раствора, встряхивают в течение 15 с и прибавляют такое количество натрия хлорида насыщенного раствора, чтобы верхний слой поднялся к горлу колбы. Отбирают 2,0 мл верхнего слоя, помещают в делительную воронку, промывают тремя порциями воды, по 2 мл каждая, и сушат полученный экстракт над натрия сульфатом безводным.

*Растворы сравнения, хроматографическая методика и анализ данных*. Если в фармакопейной статье нет других указаний, поступают, как указано в методике 1.