**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |  |
| --- | --- |
| **Аскорбиновая кислота + Бетакаротен + Биотин + Пиридоксина гидрохлорид + Ретинола ацетат + Рибофлавин + Тиамина нитрат + альфа-Токоферола ацетат + Фолиевая кислота + Цианокобаламин + Магний + Селен + Цинк таблетки** |  **ФС** |
| ***Acidum ascorbicum + Betacarotenum + Biotinum + Pyridocxini hydrochloridum + Retinoli acetas + Riboflavinum + Thiamini nitras + ɑ-Tocopherylis acetas + Acidum folicum + Cyanocobalaminum + Magnesium + Selenium + Zincum, tabulettae***  |  **Вводится впервые** |

 Настоящая фармакопейная статья распространяется на лекарственный препарат Аскорбиновая кислота + Бетакаротен + Биотин + Пиридоксина гидрохлорид + Ретинола ацетат + Рибофлавин + Тиамина нитрат + альфа-Токоферола ацетат + Фолиевая кислота + Цианокобаламин + Магний + Селен + Цинк таблетки.

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

Препарат содержит от заявленного количества: не менее 90 % и не более 110 % аскорбиновой кислоты C6H8O6; не менее 90 % и не более 110 % бетакаротена C40H56; не менее 90 % и не более 110 % биотина С10H88N2O3S; не менее 90 % и не более 110 % пиридоксина гидрохлорид C8H11NO3·HCI; не менее 90 % и не более 110 % ретинола ацетата С20Н30О; не менее 90 % и не более 110 % рибофлавина C17H20N4O6 ; не менее 90 % и не более 110 % тиамина нитрата C12H17N4OSˑNO3; не менее 90 % и не более 110 % альфа-токоферола ацетата C29H50O2 ; не менее 85 % и не более 115 % фолиевой кислоты C₁₉H₁₉N₇O₆; не менее 90 % и не более 110 % цианокобаламина C63H88CoN14O14P; не менее 90 % и не более 110 % магния (в форме магния оксида); не менее 90 % и не более 110 % цинка (в форме цинка оксида); не менее 90 % и не более 110 % селена (в форме натрия селенита).

В состав препарата входят вспомогательные вещества.

Описание. Содержание раздела должно соответствоватьтребованиям ОФС «Таблетки».

**Подлинность**

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

Времена удерживания основных пиков на хроматограмме испытуемых растворов ретинола ацетата, аскорбиновой кислоты, пиридоксина гидрохлорида, тиамина нитрата, рибофлавина, биотина, фолиевой кислоты, бетакаротена, альфа-токоферола ацетата, цианокобаламина должны соответствовать по времени удерживания соответствующим пикам на хроматограмме стандартного раствора

*Магний, цинк, селен*. Определение проводят по разделу «Количественное определение» методом атомно-абсорбционной спектрометрии (АAС) в соответствии с ОФС «Атомно-абсорбционная спектрометрия».

Наличие абсорбции испытуемых растворов и растворов СО железа, цинка, селена, должна быть одного порядка при длинах волн (магния металлического, цинка оксида, селена металлического), соответственно.

**Подлинность⃰**

*Фолиевая кислота, биотин.* Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс - селективным детектором (ВЭЖХ – МСД).

Время удерживания основных пиков на хроматограмме испытуемого раствора, полученных при количественном определении, должны соответствовать временам удерживания основных пиков на хроматограммах стандартных растворов. Определение проводят в соответствии с ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография» и «Масс - спектрометрия».

*Цианокобаламин.* Метод масс - спектрометрия с индуктивно связанной плазмой (ИСП - МС).

Подлинность устанавливают одновременно с количественным определением методом масс - спектрометрии с индуктивно связанной плазмой: масс - спектр кобальта в испытуемом растворе соответствует аналогичной характеристике СО цианокобаламина. Определение проводят в соответствии с ОФС «Масс - спектрометрия».

*Магний, Цинк, Селен.* Метод масс-спектрометриb с индуктивно связанной плазмой (ИСП - МС).

Подлинность минералов устанавливают, одновременно с количественным определением методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой: масс - спектр элемента в испытуемом растворе соответствует аналогичной характеристике СО элемента. Определение проводят в соответствии с ОФС «Масс - спектрометрия».

**Однородность массы.** Определение проводят в соответствии с ОФС «Однородность массы дозированных лекарственных форм».

**Распадаемость.** Не более 30 мин. Определение проводят в соответствии с ОФС «Распадаемость таблеток и капсул» с использованием дисков.

**Микробиологическая чистота.** Испытание проводят в соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

**Количественное определение**

*Ретинола ацетат.* Определение проводят методом ВЭЖХ.

*Испытуемый раствор.* Точная навеска порошка растертых таблеток, эквивалентная 1,587 мг ретинола ацетата помещают в хроматографический флакон вместимостью 20 мл, прибавляют 6 мл хлористоводородной кислоты раствора 0,2 М, перемешивают. Флакон помещают в ультразвуковую баню при температуре 40 °С на 10 мин. После охлаждения до комнатной температуры прибавляют 3 мл метанола. Флакон помещают в ультразвуковую баню при температуре 40 - 45 °С на 20 мин. После охлаждения до комнатной температуры прибавляют 2 млметилтретбутилового эфира.

Хроматографический флакон помещают в ультразвуковую баню при температуре 25 - 30 °С на 10 мин. После охлаждения до комнатной температуры раствор центрифугируют при 3000 - 4000 об/мин в течение 10 - 15 мин, слой извлечения (метилтретбутилового эфира) отделяют, фильтруют и помещают в хроматографическую флакон, вместимостью 2 мл.

*Стандартный раствор 1 ретинола ацетата 5 мг/мл.* 692,1 мг (точная навеска) СО ретинола ацетата помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 25 мл метилтретбутилового эфира, помещают в ультразвуковую баню при температуре 30 °С на 10 мин, охлаждают до комнатной температуры и добавляют метилтретбутилового эфира до метки (раствор 1 с концентрацией ретинола ацетата 5 мг/мл).

*Раствор 2 СО ретинола ацетата с концентрацией 2,5 мг/мл.* 100 мл раствора 1 помещают в мерную пробирку вместимостью 20 мл, доводят метилтретбутиловым эфиром до метки и перемешивают (раствор 2 с кон­центрацией ретинола ацетата 2,5 мг/мл).

*Раствор 3 СО ретинола ацетата с концентрацией 1,5 мг/мл для проверки пригодности хроматографической системы.* 6,0 мл раствора 1 помещают в мерную пробирку вместимостью 20 мл, доводят метилтретбутиловым эфиром до метки и перемешивают (раствор 3 с концентрацией ретинола ацетата 1,5 мг/мл).

*Раствор 4 СО ретинола ацетата с концентрацией 1,0 мг/мл.* 4,0мл раствора 1 помещают в мерную пробирку вместимостью 20 мл, доводят метилтретбутиловым эфиром до метки и перемешивают (раствор 4 с кон­центрацией ретинола ацетата 1,0 мг/мл). Растворы хранят в химической посуде из темного стекла в холодильнике в течение 7 сут.

*Подвижная фаза* (ПФ) - А: метанол для ВЭЖХ,

*Подвижная фаза* (ПФ) - В: тетрагидрофуран для ВЭЖХ;

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка: | 150 х 4,6 мм, сорбент: силикагель октадецилсилильный (С18) с диаметром частиц 5 мкм.  |
| Температура колонки:  | 25 °С |
| Детектор: | Ультрафиолетовый |
| Длина волны детектирования | УФ, 267 нм  |
| Объем пробы: | 5 мкл |
| Скорость потока: | 1,0 мл/мин |

Время хроматографирования - 12 мин;

Режим хроматографического разделения - градиентный:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Время, мин | Подвижная фаза % А | Подвижная фаза % В |
| 0,00 | 100,0 | 0,0 |
| 5,00 | 100,0 | 0,0 |
| 10,00 | 20,0 | 80,0 |

Колонку промывают подвижной фазой 20 - 30 мин до достижения стабильной базовой линии, вводят и анализируют стандартные растворы и испытуемый раствор. Регистрируют хроматограммы. По площадям пиков на хроматограммах стандартных растворов строят калибровочные зависимости площади пиков от концентраций испытуемых растворов. По площадям пиков на хроматограмме испытуемого раствора находят концентрацию ретинола ацетата в извлечении. Время стабилизации хроматографической системы после проведения анализа составляет 10 мин.

Проверка пригодности хроматографической системы.

Для оценки пригодности хроматографиической системы используется стандартный раствор ретинола ацетата (раствор 3 с концентрацией ретинола ацетата 1,5 мг/мл).

* относительное стандартное отклонение площади пиков ретинола ацетата не более 5,0 % (n = 6);
* асимметрия пиков составляет не более 1,9;
* число теоретических тарелок, рассчитанное по пику ретинола ацетата, составляет не менее 4000.

 Содержание ретинола ацетата (X) в одной таблетке в процентах (%) от заявленного количества вычисляют по формуле:

Х=$\frac{С∙V\_{э}ˑG·100}{a\_{1}∙kˑL∙1000}$,=$ \frac{С∙V\_{э}ˑG}{a\_{1}∙kˑL∙10}$,

где: С - концентрация ретинола ацетата в испытуемом растворе, мг/мл;

Vэ = 2 - объем метилтретбутилового эфира, используемого при экстракции образца, мл;

 a1 - навеск образца, мг;

k = 3,00ˑ104  - коэффициент пересчета ME ретинола ацетата, мг;

G - средняя масса таблетки, мг;

1000 – пересчет миллиграмм, г;

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

*Аскорбиновая кислота и пиридоксина гидрохлорид*.Определение проводят методом ВЭЖХ со спектрофотометрическим детектированием.

*Испытуемый раствор.* Точную навеску порошка растертых таблеток, эквивалентную по содержанию 49,58 мг аскорбиновой кислоты, 24,30 пиридоксина гидрохлорида помещают в хроматографический флакон с завинчивающейся крышкой объемом 40 мл и на аналитических весах с точностью до 0,1 мг фиксируют массу образца. Затем прибавляют 30 мл уксусной кислоты раствора 1 % в смеси ацетонитрил - вода в соотношении компонентов 50 : 50, плотно закрывают крышкой и перемешивают. Флакон помещают в ультразвуковую баню при температуре 40 - 45 °С на 25 мин. После охлаждения до комнатной температуры раствор центрифугируют при 3000 - 4000 об/мин в течение 10 мин, слой извлечения отделяют, фильтруют через шприцевой фильтр с диаметром пор 0,45 мкм и помещают в хроматографический флакон с завинчивающейся крышкой объемом 15 мл.

*Уксусной кислоты раствор 1 % в ацетонитриле*. 10 мл уксусной кислоты ледяной растворяют в 990 мл ацетонитрила для ВЭЖХ.

*Натрия лаурилсульфата раствор 0,001 М*. 0,288 г натрия лаурилсульфата растворяют в 1000 мл воды для хроматографии. pH раствора доводят фосфорной кислотой до 3,0 ± 0,1 (потенциометрически), фильтруют через фильтр с диаметром пор 0,47 мкм.

*Стандартные раствора аскорбиновой кислоты.*

*Стандартный раствор 1А аскорбиновой кислоты 2,5 мг/мл.* Около 50 мг (точная навеска) СО аскорбиновой кислоты помещают в хроматографический флакон объемом 40 мл, прибавляют 20 мл уксусной кислоты раствора 1 % в смеси ацетонитрил - вода в соотношении компонентов 50 : 30, плотно закрывают крышкой и перемешивают. Флакон помещают в ультразвуковую баню при температуре 40 °С на 10 мин, охлаждают до комнатной температуры (раствор 1А с концентрацией аскорбиновой кислоты 2,5 мг/мл).

*Стандартный раствор 2А аскорбиновой кислоты 1,0 мг/мл для проверки пригодности хроматографической системы.* 8,0 мл раствора 1А с концентрацией 2,5 мг/мл помещают в хроматографический флакон объемом 40 мл, прибавляют 12 мл уксусной кислоты раствора 1 % в смеси ацетонитрил - вода в соотношении компонентов 50 : 30, плотно закрывают крышкой и перемешивают (раствор 2А с концентрацией аскорбиновой кислоты в смеси 1,0 мг/мл).

*Стандартный раствор 3А аскорбиновой кислоты 0,5 мг/мл. 4,0* мл раствора 1А помещают в хроматографический флакон объемом 40 мл, прибавляют 16 мл уксусной кислоты раствора 1 % в смеси ацетонигрил - вода в соотношении компонентов 50 : 30, плотно закрывают крышкой и перемешивают (раствор ЗА с концентрацией аскорбиновой кислоты в смеси 0,5 мг/мл). Растворы готовят в защищенном от света месте и используют свежеприготовленными. *Стандартные растворы пиридоксина гидрохлорида.*

*Стандартный раствор 1Б пиридоксина гидрохлорида 1,0 мг/мл.* Около 20 мг (точная навеска) СО пиридоксина гидрохлорида помещают в хроматографический флакон объемом 40 мл, прибавляют 20 мл уксусной кислоты раствора 1 % в смеси ацетонитрил - вода в соотношении компонентов 50 : 50, плотно закрывают крышкой и перемешивают. Флакон помещают в ультразвуковую баню при 40 °С на 10 мин, охлаждают до комнатной температуры (раствор 1Б с концентрацией пиридоксина гидрохлорида в смеси 1,0 мг/мл).

*Стандартный раствор 2Б пиридоксина гидрохлорида 0,5 мг/мл для проверки пригодности хроматографической системы . 10* мл раствора 1Б помещают в хроматографический флакон объемом 40 мл, прибавляют 10 мл уксусной кислоты раствора 1 % в смеси ацетонитрил - вода в соотношении компонентов 50 : 50, плотно закрывают крышкой и перемешивают (раствор 2Б с концентрацией пиридоксина гидрохлорида в смеси 0,5 мг/мл).

*Стандартный раствор 3Б пиридоксина гидрохлорида 0,25 мг/мл*. 5мл раствора 1Б помещают в хроматографический флакон объемом 40 мл, прибавляют 15 мл уксусной кислоты раствора 1 % в смеси ацетонитрил - вода в соотношении компонентов 50 : 50, плотно закрывают крышкой и перемешивают (раствор ЗБ с концентрацией пиридоксина гидрохлорида в смеси 0,25 мг/мл). Растворы готовят в защищенном от света месте и используют свежеприготовленными.

*Подвижная фаза А*: натрия лаурилсульфата раствор 0,001 М (pH = 3,0 ± 0,1);

*Подвижная фаза - В*: ацетонитрил для ВЭЖХ.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка: | 150 х 4,6 мм, сорбент: силикагель октадецилсилильный (С18) с диаметром частиц 5 мкм.  |
| Температура колонки:  | 25 °С |
| Детектор: | Ультрафиолетовый |
| Длина волны детектирования | УФ, 240 нм аскорбиновая кислотаУФ, 290 нм пиридоксин |
| Объем пробы: | 1 мкл |
| Скорость потока: | 1,0 мл/мин |

Время хроматографирования - 35 мин;

Режим хроматографического разделения - градиентный:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Время, мин | Подвижная фаза % А | Подвижная фаза % В |
| 0,00 | 100,0 | 0,0 |
| 1,00 | 100,0 | 0,0 |
| 2,00 | 75,0 | 25,0 |

Колонку промывают подвижной фазой до достижения стабильной базовой линии, вводят и анализируют стандартные растворы и испытуемый раствор.

Регистрируют хроматограммы. По площадям пиков на хроматограммах стандартных растворов строят калибровочные зависимости площади пиков от концентраций. По площади пика на хроматограмме испытуемого раствора находят концентрацию аскорбиновой кислоты в извлечении. Стабилизации хроматографической системы между анализами растворов не требуется.

Проверка пригодности хроматографической системы.

Для оценки пригодности хроматографиической системы используются стандартные растворы аскорбиновой кислоты и пиридоксина гидрохлорида (раствор 2А с концентрацией аскорбиновой кислоты в смеси 1,0 мг/мл, раствор 2Б с концентрацией пиридоксина гидрохлорида в смеси 0,5 мг/мл). Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

* относительное стандартное отклонение площади пиков аскорбиновой кислоты и пиридоксина не более 5,0 % (n = 6);
* число теоретических тарелок, рассчитанное по пику аскорбиновой

 кислоты составляет не менее 2300;

* разрешение между пиками составляет не менее 2;
* асимметрия пиков аскорбиновой кислоты и пиридоксина не

 превышает 1,9

Содержание аскорбиновой кислоты и пиридоксина гидрохлорида (X) в одной таблетке в процентах от заявленного количества вычисляют по формуле:

Х=$\frac{C∙V\_{э}∙G∙100}{a\_{1}ˑL∙1000}=\frac{C∙V\_{э}∙G}{a\_{1}∙L∙10}$,

где: С - концентрация аскорбиновой кислоты или пиридоксина гидрохлорида в испытуемом растворе, мг/мл;

Vэ = 30 - объем экстрагента, используемого при экстракции образца, мл;

a1 – масса навески образца, мг;

G - средняя масса таблетки, мг;

1000 – пересчет миллиграмм, г;

L - заявленное количество аскорбиновой кислоты или пиридоксина гидрохлорида в одной таблетке, мг.

 *Тиамина нитрат и рибофлавин*.Определение проводят методом ВЭЖХ со спектрофотометрическим детектированием.

*Испытуемый раствор*. Точную навеску порошка растертых таблеток, эквивалентную по содержанию 3,098 мг тиамина нитрата, 2,705 рибофлавина помещают в хроматографический флакон с завинчивающейся крышкой объемом 15 мл и на аналитических весах с точностью до 0,1 мг фиксируют массу образца. Затем прибавляют 10 мл смеси калия карбоната раствора 0,1 М в воде с ацетонитрилом в соотношении 70 : 30, плотно закрывают крышкой и перемешивают. Флакон помещают в ультразвуковую баню при температуре 40 - 45 °С на 25 мин. После охлаждения до комнатной температуры раствор центрифугируют при 3000-4000 об/мин в течение 10 мин, слой экстракта отделяют, фильтруют через шприцевой фильтр с диаметром пор 0,45 мкм и помещают в хроматографический флакон с завинчивающейся крышкой объемом 15 мл.

*Калия карбоната раствор 0,1 М в смеси ацетонитрил-вода в соотношении 30 : 70 (по объему).* 13,8 г калия карбоната растворяют в 1000 мл смеси ацетонитрила с водой для храматографии в соотношении 30 : 70 (по объему).

*Натрия лаурилсульфата раствор 0,001М.* См. примечание 3 к разделу «Количественное определение. Аскорбиновая кислота и пиридоксина гидрохлорид»

*Уксусной кислоты раствор 0,1 % в смеси апетонитрил - вода.* 1,0 мл уксусной кислоты ледяной растворяют в 999 мл смеси ацетонитрила с водой для хроматографии в соотношении 99 : 1.

*Стандартные растворы тиамина нитрата*.

*Стандартный раствор 1А тиамина нитрата 1,0 мг/мл.* Около 10 мг (точная навеска) СО тиамина нитрата помещают в хроматографический флакон объемом 15 мл, прибавляют 10 мл смеси калия карбоната раствора 0,1 М в смеси ацетонитрил - вода в соотношении 30 : 70 (по объему), плотно закрывают крышкой и перемешивают. Флакон помещают в ультразвуковую баню при температуре 40 °С на 10 мин, охлаждают до комнатной температуры (раствор 1А с концентрацией тиамина нитрата в смеси 1,0 мг/мл).

*Стандартный раствор 2А тиамина нитрата 0,5 мг/мл.* 5мл раствора 1А помещают в хроматографический флакон объемом 15 мл, прибавляют 5 мл смеси калия карбоната раствора 0,1 М в воде с ацетонитрилом в соотношении 70 : 30 и перемешивают (раствор 2А с концентрацией тиамина нитрата в смеси 0,5 мг/мл).

*Стандартный раствор 3А тиамина нитрата 0,25 мг/мл для проверки пригодности хроматографической системы.* 2,5мл раствора 1А помещают в хроматографический флакон объемом 15 мл, прибавляют 7,5 мл смеси 0,1 М раствора калия карбоната в воде с ацетонитрилом в соотношении 70 : 30 и перемешивают (раствор ЗА с концентрацией тиамина нитрата в смеси 0,25 мг/мл).

 *Стандартный раствор 4А тиамина нитрата 0,1 мг/мл.* 2 мл раствора 2А помещают в хроматографический флакон объемом 15 мл, прибавляют 8 мл смеси калия карбоната раствора 0,1 М в воде с ацетонитрилом в соотношении 70 : 30 и перемешивают (раствор 4А с концентрацией тиамина нитрата в смеси 0,1 мг/мл).

 *Стандартные растворы рибофлавина.*

 *Стандартный раствор 1Б рибофлавина 1,0 мг/мл.* Около 10 мг (точная навеска) СО рибофлавина помещают в хроматографический флакон объемом 15 мл, прибавляют 10 мл смеси калия карбоната раствора 0,1 М в воде с ацетонитрилом в соотношении 70 : 30, плотно закрывают крышкой и перемешивают. Флакон помещают в ультразвуковую баню при температуре 40 °С на 10 мин, охлаждают до комнатной температуры (раствор 1Б с концентрацией рибофлавина в смеси 1,0 мг/мл).

 *Стандартный раствор 2Б рибофлавина 0,5 мг/мл.* 50мл раствора 1Б помещают в хроматографический флакон объемом 15 мл, прибавляют 5 мл смеси калия карбоната раствора 0,1 М в воде с ацетонитрилом в соотношении 70 : 30 и перемешивают (раствор 2Б с концентрацией рибофлавина в смеси 0,5 мг/мл).

 *Стандартный раствор 3Б рибофлавина 0,25 мг/мл для проверки пригодности хроматографической системы.* 2,5мл раствора 1Б помещают в хроматографический флакон объемом 15 мл, прибавляют 7,5 мл смеси калия карбоната раствора 0,1 М в воде с ацетонитрилом в соотношении 70 : 30 и перемешивают (раствор 3Б с концентрацией рибофлавина в смеси 0,25 мг/мл).

*Стандартный раствор 4Б рибофлавина 0,1 мг/мл.* 2,0 мл раствора 2Б помещают в хроматографический флакон объемом 15 мл, прибавляют 8 мл смеси калия карбоната раствора 0,1 М в воде с ацетонитрилом в соотношении 70 : 30 и перемешивают (раствор 4Б с концентрацией рибофлавина в смеси 0,1 мг/мл).

Растворы готовят в защищенном от света месте и используют свежеприготовленными.

 *Подвижная фаза А:* натрия лаурилсульфата раствор 0,001 М (pH = 3,0 ± 0,1);

 *Подвижная фаза: В* - уксусной кислоты раствор 0,1 % в смеси ацетонитрил - вода в соотношении 99 : 1.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка: | 150 х 4,6 мм, сорбент: силикагель октадецилсилильный (С18) с диаметром частиц 5 мкм.  |
| Температура колонки:  | 25 °С |
| Детектор: | Ультрафиолетовый |
| Длина волны детектирования | УФ, 240 нм тиаминУФ, 260 нм рибофлавин |
| Объем пробы: | 5 мкл |
| Скорость потока: | 1,2 мл/мин |

Время хроматографирования - 25 мин;

Режим хроматографического разделения - градиентный:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Время, мин | Подвижная фаза % А | Подвижная фаза % В |
| 0,00  | 90,0 | 10,0 |
| 15,00  | 10,0 | 90,0 |
| 18,00 | 90,0 | 10,0 |

Колонку промывают подвижной фазой до достижения стабильной базовой линии, вводят и анализируют стандартные растворы и испытуемый раствор. Регистрируют хроматограммы. По площадям пиков на хроматограммах стандартных растворов строят калибровочные зависимости площади пиков от концентраций. По площадям пиков на хроматограммах испытуемого раствора находят концентрации тиамина нитрата, рибофлавина в извлечении. Стабилизации хроматографической системы между анализами растворов не требуется.

Проверка пригодности хроматографической системы.

Для оценки пригодности хроматографиической системы используются стандартные растворы тиамина нитрата и рибофлавина (раствор ЗА с концентрацией тиамина нитрата в смеси 25 мг/мл, раствор ЗБ с концентрацией рибофлавина в смеси 0,25 мг/мл).

Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

* относительное стандартное отклонение площади пиков витаминов не более 5,0 % (n = 6);
* разрешение между пиками тиамина и рибофлавина составляет не менее 1,2;
* число теоретических тарелок, рассчитанное по пику рибофлавина составляет не менее 2100;
* асимметрия пиков тиамина и рибофлавина не превышает 1,9.

Содержание тиамина нитрата и рибофлавина (X) в одной таблетке в процентах от заявленного количества вычисляют по формуле:

Х=$\frac{C∙V\_{э}∙G∙100}{a\_{1}ˑL∙1000}=\frac{C∙V\_{э}∙G}{a\_{1}∙L∙10}$,

где: С - концентрация тиамина нитрата или рибофлавина в испытуемом растворе, мг/мл;

Vэ = 30 - объем экстрагента, используемого при экстракции образца, мл;

a1 – масса навески образца, мг;

G - средняя масса таблетки, мг;

1000 – пересчет миллиграмм, г;

L - заявленное количество тиамина нитрата и рибофлавина в одной

таблетке, мг.

*Фолиевая кислота.* Определение проводят методом ВЭЖХ.

Обязательна защита испытуемого раствора и стандартных образцов от света (работа с использованием посуды из «янтарного» стекла).

Для приготовления водных растворов используется вода высшей степени очистки.

*Испытуемый раствор*. Точную навеску порошка растертых таблеток, эквивалентную около 2,86 мг фолиевой кислоты помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 70 - 75 мл смеси растворов «А» и «Б» (в соотношении 80 : 20, соответственно), обрабатывают на ультразвуковой бане при температуре 35 - 40 °С в течение 10 - 15 мин, охлаждают до комнатной температуры, доводят объем раствора той же смесью растворителей до метки и перемешивают. Смесь оставляют стоять в течение 5 мин в защищенном от света месте, затем верхний слой декантируют и, с помощью шприца, фильтруют 10 мл раствора через микроколонку со скоростью около 3 - 4 мл/мин, отбрасывая первые 3 мл фильтрата. Раствор используют свежеприготовленным.

 *Стандартный раствор.* Около 28,5 мг (с точностью до 0,05 мг) СО фолиевой кислоты помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 80 мл аммония гидроксида раствора 0,05 М, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают. 10 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают.

*Подвижная фаза А:* 3,00 г натрия гептансульфоната и 3,4 г калия дигидрофосфата растворяют в 1000 мл воды для хроматографии, pH раствора доводят фосфорной кислотой до значения 2,9 - 3,0, фильтруют через фильтр с диаметром пор 0,2 мкм. При использовании аналогичных колонок pH может варьироваться в пределах 2,5 - 3,0. Раствор используют свежеприготовленным.

 *Подвижная фаза В:* Ацетонитрил для жидкостной хроматографии фильтруют через фильтр с диаметром пор 0,2 мкм.

Хроматографические условия:

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка: | 150 х 3,9 мм, сорбент: силикагель октадецилсилильный (С18) с диаметром частиц 5 мкм, размер пор 100 Å. |
| Температура колонки:  | 25 °С |
| Детектор: | Ультрафиолетовый  |
| Длина волны детектирования | УФ, 283 нм  |
| Объем пробы: | 2 мкл |
| Скорость потока: | 1,0 мл/мин |
| Давление в системе  | 41 бар |

Время хроматографирования - 22 мин;

Режим хроматографического разделения - градиентный:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Время, мин | Подвижная фаза % А | Подвижная фаза % В |
| 0,01  | 89,0 | 11,0 |
| 7,00  | 89,0 | 11,0 |
| 8,00  | 84,0 | 16,0 |
| 18,00  | 84,0 | 16,0 |
| 22,00  | 89,0 | 11,0 |
| 26,00 | 89,0 | 11,0 |

Последовательно хроматографируют стандартный и испытуемый растворы, регистрируют хроматограммы.

*Проверка пригодности хроматографической системы.*

Для оценки пригодности хроматографиической системы используется стандартный раствор фолиевой кислоты. Хроматографическая система считается пригодной, если на хроматограмме стандартного раствора:

* число теоретических тарелок, рассчитанное по пику фолиевой кислоты, составляет не менее 2500;
* относительное стандартное отклонение, рассчитанное для площади пика фолиевой кислоты, составляет менее 1,5 % (n = 6);
* асимметрия пика фолиевой кислоты не превышает 1,9

Содержание фолиевой кислоты (X) в одной таблетке в процентах от заявленного количества вычисляют по формуле:

Х=$\frac{S\_{1}∙a\_{o}∙100∙\left(100-W\right)∙P·100}{S\_{o}∙V\_{o}∙a\_{1}∙100·1000∙L}∙G=\frac{S\_{1}∙a\_{o}∙\left(100-W\right)∙P}{S\_{o}∙V\_{o}∙a\_{1}∙10∙L}∙G,$

где: So - площадь пика фолиевой кислоты на хроматограмме стандартного

 раствора;

S1 - площадь пика фолиевой кислоты на хроматограмме испытуемого

раствора;

ao - навеска СО фолиевой кислоты, взятая для приготовления стандартного раствора, мг;

Vo - разведение раствора стандартного образца (1000);

a1 - навеска испытуемого образца, г;

P - содержание основного вещества в СО фолиевой кислоты, в %;

W - содержание влаги в СО фолиевой кислоты, %;

G - средняя масса таблетки, г

L - заявленное количество фолиевой кислоты в одной таблетке, мг.

1000 – пересчет миллиграмм, г.

*Биотин.* Определение проводят методом ВЭЖХ.

*Испытуемый раствор.* Точную навеску порошка растертых таблеток, эквивалентную по содержанию около 2,84 мг биотина помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 40 мл аммиака раствора 0,05 М, обрабатывают на ультразвуковой бане при комнатной температуре в течение 10 - 15 мин, охлаждают до комнатной температуры, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают. Оставляют стоять в течение 5 минут в защищенном от света месте и фильтруют раствор через фильтр с диаметром пор 0,2 мкм, отбрасывая первые 3 мл фильтрата. Раствор используют свежеприготовленным.

*Стандартный раствор.* Около 15 мг (с точностью до 0,05 мг) СО биотина помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 20 мл аммиака раствора 0,05 М, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают. 10 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

 *Раствор «А».* 3,00 г натрия гептансульфоната и 3,4 г калия дигидрофосфата растворяют в 1000 мл воды для хроматографии, pH раствора доводят фосфорной кислотой до значения 2,9 - 3,0, фильтруют через фильтр с диаметром пор 0,2 мкм. При использовании аналогичных колонок pH может варьироваться в пределах 2,5 - 3,0. Раствор используют свежеприготовленным.

 *Раствор «B».* Ацетонитрил для жидкостной хроматографии фильтруют через фильтр с диаметром пор 0,2 мкм.

*Подвижная фаза: А : B* в соотношении 84 : 16.

Хроматографические условия:

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка: | 150 х 3,9 мм, сорбент: силикагель октадецилсилильный (С18) с диаметром частиц 5 мкм, размер пор 100 Å. |
| Температура колонки:  | 25 °С |
| Детектор: | Ультрафиолетовый |
| Длина волны детектирования | УФ, 205 нм  |
| Объем пробы: | 20 мкл |
| Скорость потока: | 1,0 мл/мин |
| Давление в системе  | 41 бар |

Время хроматографирования - 22 мин;

Последовательно хроматографируют стандартный и испытуемый растворы, регистрируют хроматограммы.

*Проверка пригодности хроматографической системы.*

Для оценки пригодности хроматографиической системы используется стандартный раствор биотина. Хроматографическая система считается пригодной для анализа, если на хроматограмме стандартного раствора:

* число теоретических тарелок, рассчитанное по пику биотина, составляет не менее 1500;
* относительное стандартное отклонение, рассчитанное для площади пика биотина, составляет менее 5 % (n = 6);
* асимметрия основного пика на хроматограмме испытуемого раствора не превышает 1,9.

Содержание биотина (X) в одной таблетке в процентах от заявленного количества вычисляют по формуле:

Х=$\frac{S\_{1}∙a\_{0}∙50∙(100-W)∙P∙1000·100}{S\_{0}∙25∙50∙a\_{1}∙100·L∙1000}∙G=\frac{S∙a\_{0}∙(100-W)∙P}{S\_{0}∙a\_{1}∙L∙25}∙G,$

где: So - площадь пика биотина на хроматограмме стандартного раствора;

S - площадь пика биотина на хроматограмме испытуемого раствора;

ао - навеска биотина, взятая для приготовления стандартного раствора, мг;

a1 - навеска испытуемого образца, в мг;

Р - содержание биотина в СО, в %;

W - содержание влаги в СО биотина, %;

G - средняя масса таблетки, мг.

L - заявленное количество биотина в одной таблетке, мг.

1000 – пересчет миллиграмм, г.

Фолиевая кислота и биотин Альтернативная методика\* Определение проводят методом ВЭЖХ с масс - селективным детектированием.

*Испытуемый раствор*. Точную навеску порошка растертых таблеток, эквивалентную около 1,145 мг фолиевой кислоты, 0,71 мг биотина помещают в хроматографический флакон с завинчивающейся крышкой объемом 15 мл и на аналитических весах с точностью до 0,1 мг фиксируют массу образца. Затем прибавляют 5 мл аммиака раствора 0,5 М в воде и перемешивают. Хроматографический флакон помещают в ультразвуковую баню при температуре 50 - 55 °С на 20 мин. После охлаждения до комнатной температуры раствор центрифугируют при 4000-6000 об/мин в течение 10 мин, слой извлечения отделяют, фильтруют через шприцевой фильтр с диаметром пор 0,45 мкм и помещают в хроматографический флакон с завинчивающейся крышкой объемом 15 мл.

*Аммиака раствор 0,5 М.* Аммиак раствор концентрированный 25 % разбавляют водой для хроматографии в соотношении 1 : 25.

*Аммиака раствор 0,5 М в ацетонитриле*. Аммиак раствор концентрированный 25 % разбавляют ацетонитрилом в соотношении 1 : 25.

*Уксусной кислоты раствор 10 %.* 100 мл уксусной кислоты ледяной растворяют в 900 мл воды для хроматографии, раствор фильтруют через фильтр с диаметром пор 0,47 мкм.

*Приготовление стандартных растворов фолиевой кислоты*.

*Стандартный раствор 1А фолиевой кислоты 0,5 мг/мл*. Около 15 мг (точная навеска) СО фолиевой кислоты помещают в хроматографический флакон объемом 40 мл, прибавляют 30 мл смеси аммиака раствора 0,5 М с ацетонитрилом в соотношении 50 : 50, перемешивают. Флакон помещают в ультразвуковую баню при температуре 30 - 40 °С на 10 мин, охлаждают до комнатной температуры (раствор 1А с концентрацией фолиевой кислоты в 0,5 мг/мл).

*Стандартный раствор 2А фолиевой кислоты 0,1 мг/мл для проверки пригодности хроматографической системы*. 2,0 мл раствора 1А помещают в хроматографический флакон объемом 15 мл, прибавляют 8,0 мл смеси (аммиака раствор 0,5 М в воде с ацетонитрилом в соотношении 50 : 50) и перемешивают (раствор 2А с концентрацией фолиевой кислоты в смеси 0,1 мг/мл).

*Стандартный раствор 3А фолиевой кислоты 0,05 мг/мл*. 1,0 мл раствора 1А помещают в хроматографический флакон объемом 15 мл, прибавляют 9,0 мл смеси (аммиака раствор 0,5 М в воде с ацетонитрилом в соотношении 50 : 50) и перемешивают (раствор ЗА с концентрацией фолиевой кислоты в смеси 0,05 мг/мл).

*Стандартный раствор 4А фолиевой кислоты 0,01 мг/мл*. 1,0 мл раствора 2А помещают в хроматографический флакон объемом 15 мл, прибавляют 9,0 мл смеси (аммиака раствор 0,5 М в воде с ацетонитрилом в соотношении 50 : 50) и перемешивают (раствор 4А с концентрацией фолиевой кислоты в смеси 0,01 мг/мл).

*Приготовление стандартных растворов биотина.*

*Стандартный раствор 1Б биотина 0,5 мг/мл.* Около 15 мг (точная навеска) СО биотина помещают в хроматографический флакон объемом 40 мл, прибавляют 30 мл растворителя (аммиака раствор 0,5 М в смеси вода - ацетонитрил в соотношении 50 : 50) и перемешивают. Флакон помещают в ультразвуковую баню при температуре 30 - 40 °С на 10 мин, охлаждают до комнатной температуры (раствор 1Б с концентрацией биотина в смеси 0,5 мг/мл).

*Стандартный раствор 2Б биотина 0,1 мг/мл для проверки пригодности хроматографической системы.* 2,0 мл раствора 1Б помещают в хроматографический флакон объемом 15 мл, прибавляют 8,0 мл растворителя (аммиака раствор 0,5 М в смеси вода - ацетонитрил в соотношении 50 : 50) и перемешивают (раствор 2Б с концентрацией биотина в смеси 0,1 мг/мл).

*Стандартный раствор 3Б биотина 0,05 мг/мл.* 5,0 мл раствора 2Б помещают в хроматографический флакон объемом 15 мл, прибавляют 5,0 мл растворителя (аммиака раствор 0,5 М в смеси вода - ацетонитрил в соотношении 50 : 50) и перемешивают (раствор ЗБ с концентрацией биотина в смеси 0,05 мг/мл).

*Стандартный раствор 4Б биотина 0,01 мг/мл.* 1,0 мл раствора 2Б помещают в хроматографический флакон объемом 15 мл, прибавляют 9,0 мл растворителя (аммиака раствор 0,5 М в смеси вода - ацетонитрил в соотношении 50 : 50) и перемешивают; (раствор 4Б с концентрацией биотина в смеси 0,01 мг/мл). Растворы готовят в защищенном от света месте и хранят в холодильнике в течение 7 дней.

*Подвижная фаза: А* - ацетонитрил для ВЭЖХ.

*Подвижная фаза: В* - вода для хроматографий.

*Подвижная фаза: С* - уксусной кислоты раствор 10 % в воде.

*Хроматографические условия:*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка: | 150 х 4,6 мм, сорбент: силикагель октадецилсилильный (С18) с диаметром частиц 5 мкм, размер пор 100 Å. |
| Температура колонки:  | 25 °С |
| Детектор: | масс – селективный с ионизацией электрораспылением при атмосферном давлении |
| Полярность | детектирование положительных ионов |
| Напряжение на фрагментаторе | 140 В |
| Скорость газа осушителя (азота) | 10 л/мин |
| Температура газа осушителя (азота) | 330 °С |
| Давление в распылителе | 3,1 бар |
| Напряжение на капилляре | 2800 В |
| Режим детектирования | селективное ионное |
| Детектируемые ионы: | 245 а.е.м., биотин |
|  | 442 а.е.м фолиевая кислота |
| Скорость подачи элюэнта: | 0,8 мл/мин |
| Объем пробы: | 3 мкл |

Время хроматографирования - 25 мин

Режим хроматографического разделения - градиентный:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Время, мин | Подвижная фаза % А | Подвижная фаза % В | Подвижная фаза % С |
| 0,00 | 10,0 | 89,0 | 1,0 |
| 1,00 | 10,0 | 89,0 | 1,0 |
| 10,00 | 40,0 | 59,0 | 1,0 |
| 11,00 | 90,0 | 9,0 | 1,0 |
| 15,00 | 90,0 | 9,0 | 1,0 |
| 16,00 | 10,0 | 89,0 | 1,0 |

Колонку промывают подвижной фазой до достижения стабильной базовой линии, вводят и анализируют стандартные растворы и испытуемый раствор. Регистрируют хроматограммы. По площадям пиков на хроматограммах стандартных растворов строят калибровочные зависимости площади пиков от концентраций. По площадям пиков на хроматограммах испытуемого раствора находят концентрации биотина и фолиевой кислоты в извлечении. Стабилизации хроматографической системы между анализами не требуется.

*Проверка пригодности хроматографической системы.*

Для оценки пригодности хроматографиической системы используются стандартные растворы фолиевой кислоты (раствор 2А) и биотина (раствор 2Б). Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

* относительное стандартное отклонение площади пика биотина не более 5,0 %(n = 6);
* число теоретических тарелок, рассчитанное по пику фолиевой кислоты, составляет не менее 2000;
* асимметрия пиков фолиевой кислоты и биотина на хроматограмме испытуемого раствора не превышает 1,9.

Содержание биотина и фолиевой кислоты (X) в одной таблетке в процентах от заявленного количества вычисляют по формуле:

Х=$\frac{C∙V\_{э}∙G∙100}{a\_{1}ˑL∙1000}=\frac{C∙V\_{э}∙G}{a\_{1}∙L∙10}$,

где: С - концентрация биотина или фолиевой кислоты в испытуемом

растворе, мг/мл;

Vэ = 10 - объем экстрагента, используемого при извлечении образца, мл;

a1 – масса навески образца, мг;

G - средняя масса таблетки, мг;

1000 – пересчет миллиграмм, г;

L - заявленное количество биотина или фолиевой кислоты в одной

таблетке, мг.

*Биотин.* Альтернативная методика⃰ Микробиологический метод. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение содержания витаминов в многокомпонентных препаратах микробиологическим методом», определение количественного содержания витаминов пробирочным методом.

 *Бетакаротен и альфа-токоферола ацетат*. Определение проводят методом ВЭЖХ.

*Испытуемый раствор*. Точную навеску порошка растертых таблеток, эквивалентную около 0,93 мг бетакаротена, 13,42 мг альфа-токоферола ацетата помещают в хроматографический флакон объемом 40 мл и на аналитических весах с точностью до 0,05 мг фиксируют массу образца. Затем прибавляют 2 мл аммиака раствора 0,1 М, флакон плотно закрывают крышкой и помещают в ультразвуковую баню при температуре 40 - 45 °С на 30 мин.

После охлаждения в термостате до температуры 15 - 20 °С прибавляют 1,0 мл ацетонитрила. Флакон плотно закрывают крышкой и помещают в ультразвуковую баню при температуре 40 - 45 °С на 15 мин. После охлаждения в термостате до температуры 15 - 20 °С прибавляют 30 мл метиленхлорида. Флакон плотно закрывают крышкой и помещают в ультразвуковую баню при температуре 40 - 45 °С на 30 мин.

После охлаждения до комнатной температуры раствор отстаивают до разделения фаз, около 10 мл метиленхлорида раствора отделяют и помещают в хроматографический флакон объемом 15 мл. Полученное извлечение центрифугируют при 3000-4000 об/мин в течение 15 минут. Затем слой извлечения в метиленхлориде пропускают через слой натрия сульфата безводного и помещают в хроматографический флакон объемом 15 мл с завинчивающейся крышкой.

*Аммиака раствор 0,1 М.* Аммиака раствор концентрированный разбавляют водой для хроматографии в соотношении 1:129.

*Приготовление стандартных растворов бетакаротена*.

*Стандартный раствор 1А бетакаротена 1,0 мг/мл.* Около 30 мг (точная навеска) СО бетакаротена помещают в хроматографический флаконобъемом 40 мл и прибавляют 30 мл метиленхлорида. Флакон помещают в ультразвуковую баню при температуре 25 °С на 10 мин (раствор 1А с концентрацией бетакаротена в метиленхлориде 1,0 мг/мл).

*Стандартный раствор 2А бетакаротена 0,1 мг/мл для проверки пригодности хроматографической системы.* 1,0 мл раствора 1А помещают в хроматографический флаконобъемом 15 мл, прибавляют 9,0 мл метиленхлорида и помещают в ультразвуковую баню при температуре 25 °С на 10 мин (раствор 2А с концентрацией бетакаротена в метиленхлориде 0,1 мг/мл).

*Стандартный раствор 3А бетакаротена 0,05 мг/мл.* 4,0 мл раствора 2А помещают в хроматографический флаконобъемом 15 мл, прибавляют 4,0 мл метиленхлорида и помещают в ультразвуковую баню при температуре 25 °С на10 мин (раствор ЗА с концентрацией бетакаротена в метиленхлориде 0,05 мг/мл).

*Стандартный раствор 4А бетакаротена 0,01 мг/мл.* 0,5 мл раствора ЗА помещают в хроматографический флаконобъемом 15 мл, прибавляют 4,5 мл метиленхлорида и помещают в ультразвуковую баню при температуре 25 °С на 10 мин (раствор 4А с концентрацией бетакаротена в метиленхлориде 0,01 мг/мл).

*Приготовление стандартных растворов альфа- токоферола ацетата.*

*Стандартный раствор 1Б альфа- токоферола ацетата 1,0 мг/мл для проверки пригодности храматографической системы.* Около 30 мг (точная навеска) СО альфа-токоферола ацетата помещают в хроматографический флаконобъемом 40 мл и прибавляют 30 мл метиленхлорида. Флакон помещают в ультразвуковую баню при температуре 25 °С на 10 мин (раствор 1Б с концентрацией альфа - токоферола в метиленхлориде 1,0 мг/мл).

*Стандартный раствор 2Б альфа- токоферола ацетата 0,5 мг/мл.* 4,0 мл раствора 1Б помещают в хроматографический флаконобъемом 15 мл, прибавляют 4,0 мл метиленхлорида и помещают в ультразвуковую баню при температуре 25 °С на 10 мин (раствор 2Б - с концентрацией альфа-токоферола в метиленхлорида 0,5 мг/мл). Растворы готовят в защищенном от света месте и хранят в холодильнике в течение 7 дней.

*Подвижная фаза:* А - хлористый метилен для ВЭЖХ,

*Подвижная фаза: В* - ацетонитрил для ВЭЖХ;

Хроматографические условия:

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка: | 150 х 4,6 мм, сорбент: силикагель октадецилсилильный (С18) с диаметром частиц 5 мкм |
| Температура колонки:  | 25 °С |
| Детектор: | Ультрафиолетовый с переменной длиной волны |
| Длина волны детектирования | УФ, 283 нм альфа-токоферола ацетата450 нм, бетакаротена |
| Объем пробы: | 5 мкл |
| Скорость подачи элюента: | 1,0 мл/мин |

Время хроматографирования - 25 мин

Режим хроматографического разделения - градиентный:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Время, мин | Подвижная фаза % А | Подвижная фаза % В |
| 0,00 | 20,0 | 80,0 |
| 4,00 | 20,0 | 80,0 |
| 12,00 | 80,0 | 20,0 |
| 15,00 | 80,0 | 20,0 |
| 20,00 | 20,0 | 80,0 |
| 25,00 | 20,0 | 80,0 |

Колонку промывают в течение 20 - 30 мин подвижной фазой до достижения стабильной базовой линии, вводят и анализируют стандартные растворы и испытуемый раствор. Регистрируют хроматограммы. По площадям пиков на хроматограммах стандартных растворов строят калибровочные зависимости площади пиков от концентраций. По площадям пиков на хроматограммах испытуемого раствора находят концентрации бетакаротена и альфа-токоферола ацетата в извлечении. Время стабилизации хроматографической системы после, проведения анализа составляет 2 мин.

*Проверка пригодности хроматографической системы.*

Для оценки пригодности хроматографиической системы используются стандартные растворы бетакаротена (раствор 2А) и альфа - токоферола ацетата (раствор 1Б). Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

* относительное стандартное отклонение площади пиков

 бетакаротена и альфа-токоферола не более 5 % (n = 6);

* число теоретических тарелок, рассчитанное по пику альфа-токоферола ацетата составляет не менее 4000;
* асимметрия пиков альфа-токоферола ацетата и бетакаротена на хроматограмме испытуемого раствора не превышает 1,9.

Содержание бетакаротена и альфа-токоферола ацетата (X) в процентах в одной таблетке вычисляют по формуле:

Х=$\frac{C∙V\_{э}∙G∙100}{a\_{1}ˑL∙1000}=\frac{C∙V\_{э}∙G}{a\_{1}∙L∙10}$,

где: С - концентрация бетакаротена и альфа-токоферола ацетата в испытуемом растворе, мг/мл;

Vэ = 31 - объем экстрагента (смесь метиленхлорида и ацетонитрила),

используемого при извлечении образца, мл;

a1 – масса навески образца, мг;

G - средняя масса таблетки, мг;

1000 – пересчет миллиграмм, г;

L - заявленное количество бетакаротена и альфа-токоферола ацетата в

одной таблетке, мг.

*Цианокобаламин.* Определение проводят методом ВЭЖХ.

*Испытуемый раствор*. Точную навеску порошка растертых таблеток, эквивалентную 14,18 мкг цианокобаламина помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 20 мл воды и помещают в ультразвуковую баню на 10 - 15 мин при комнатной температуре. Доводят объем раствора водой до метки, перемешивают. Осадок отделяют центрифугированием, надосадочную жидкость фильтруют через фильтр с диаметром пор 0,20 - 0,45 мкм. Раствор должен быть свежеприготовленным.

Приготовление стандартного раствора А цианокобаламина. Около 40 мг (точная навеска) СО цианокобаламина помещают в мерную колбу вместимостью 200 мл, растворяют в 100 - 150 мл воды и доводят объем раствора водой до метки. 5 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают (раствор А). Раствор А хранят при комнатной температуре в течение недели.

Стандартный раствор цианокобаламина 1 мкг/мл. 10 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 70 - 80 мл подвижной фазы (ПФ), доводят объем раствора ПФ до метки, перемешивают и фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор 0,20 - 0,45 мкм. 1 мл полученного раствора содержит 1,0 мкг цианокобаламина. Раствор должен быть свежеприготовленным.

Подвижная фаза. 1,0 мл фосфорной кислоты концентрированной растворяют в 750 мл воды. Раствор фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор 0,20 - 0,45 мкм, к раствору прибавляют 250 мл метанола (для жидкостной хроматографии), перемешивают и дегазируют любым удобным способом. Раствор хранят в плотно закрытом сосуде при комнатной температуре в течение 3-х недель.

Возможна корректировка соотношения водного раствора и метанола, чтобы достигались критерии теста проверка пригодности храматографмческой системы.

Хроматографические условия:

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка: | 150 х 3,9 мм, 150 х4,6 мм сорбент: силикагель октадецилсилильный (С18) с диаметром частиц 3 - 6 мкм, диаметром пор 60-150 Å |
| Температура колонки:  | 18 - 25 °С |
| Детектор: | УФ с переменной длиной волны |
| Длина волны детектирования | 550 нм |
| Объем пробы: | 100 (или 200) мкл |
| Скорость подачи элюента: | 1,0 мл/мин для колонок диаметром 4,6 и 3,9 мм размер частиц 5-6 мкм |
|  | 0,45 мл/мин (для колонки диаметром 3 мм, размер частиц 3-4 мкм) |

Колонку промывают подвижной фазой до достижения стабильной базовой линии, вводят и анализируют раздельно испытуемый и стандартный растворы. Регистрируют хроматограммы.

Для оценки пригодности хроматографиической системы используются стандартный раствор цианокобаламина. Хроматографическая система считается пригодной, если на хроматограмме стандартного раствора:

* число теоретических тарелок, рассчитанное по пику цианокобаламина, составляет не менее 1500;

— асимметрия пика цианокобаламина не более 1,5;

— относительное стандартное отклонение площади пика не более 5,0 % (n = 6).

Содержание цианокобаламина (Х) в одной таблетке в процентах от заявленного количества вычисляют по формуле:

Х=$\frac{S\_{1}∙a\_{0}∙25∙(100-W)∙5∙10∙P∙1000∙100}{S\_{0}∙a\_{1}∙L∙200∙100∙100∙100∙1000}∙G=\frac{S\_{1}∙a\_{0}∙(100-W)∙P}{S\_{0}∙a\_{1}∙L∙1600}G$

где: So - площадь пика цианокобаламина на хроматограмме стандартного

 раствора;

S1 - площадь пика цианокобаламина на хроматограмме испытуемого раствора;

а0 - навеска стандартного образца, взятая для приготовления стандартного раствора, мг;

*a1* – масса навески образца, мг;

Р - содержание цианокобаламина в стандартном образце, долях;

W - содержание влаги в стандартном образце цианокобаламина, %;

1. - коэффициент пересчета мг, г;

G - средняя масса таблетки, мг;

L - заявленное количество цианокобаламина в одной таблетке, мг.

1000– пересчет миллиграмм, г.

*Цианокобаламин*(альтернативная методика)\* Определение проводят методом масс-спектрометрией с индуктивно связанной плазмой (ИСП-МС).

*Испытуемый раствор.* Точную навеску порошка растертых таблеток, эквивалентную 10,64 мкг цианокобаламина помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 20 мл смеси кислот (приготовление см. Примечание) и выдерживают на ультразвуковой бане 0,5 ч при температуре не менее 60 °С. После охлаждения до комнатной температуры доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Полученный раствор фильтруют через фильтр с диаметром пор 0,20 - 0,45 мкм.

*Смесь кислот.* Смешивают 2 части хлористоводородной кислоты раствора 25 %, 1 часть азотной кислоты раствора 65 % и 1 часть воды очищенной.

*Приготовление стандартных растворов цианокобаламина.*

*Стандартный раствор 1 цианокобаламина 0,4 мкг/мл.* Около 40 мг (точная навеска) СО цианокобаламина помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, растворяют в 200 - 250 мл смеси кислот и выдерживают на ультразвуковой бане 0,5 ч при температуре не менее 60 °С. После охлаждения до комнатной температуры доводят объем раствора водой до метки. 1 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают (раствор 1- в 1 мл содержится 0,4 мкг цианокобаламина).

*Стандартный раствор 2 цианокобаламина 0,8 мкг/мл.* Около 80 мг (точная навеска) СО цианокобаламина помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, растворяют в 200 - 250 мл смеси кислот и выдерживают на ультразвуковой бане 0,5 ч при температуре не менее 60 °С. После охлаждения до комнатной температуры доводят объем раствора водой до метки. 1 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл доводят объем раствора водой до метки и перемешивают (раствор 2 — в 1 мл содержится 8 мкг цианокобаламина).

*Стандартный раствор 3 цианокобаламина 1,0 мкг/мл.* Около 10 мг (точная навеска) СО цианокобаламина помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 50 мл смеси кислот и выдерживают на ультразвуковой бане 0,5 ч при температуре не менее 60 °С. После охлаждения до комнатной температуры доводят объем раствора водой до метки. 1 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают (раствор 3; в 1 мл содержится 1 мкг цианокобаламина.). Растворы используют свежеприготовленными.

Условия проведения анализа методом ИСП-МС:

|  |  |
| --- | --- |
| Прибор | Cпектрометр с индуктивно-связанной плазмой ICP -MS (АЭС). |
| Мощность генератора плазмы, КВт | 1,0 |
| Номинальная частота, МГц | 40 |
| Объемная скорость газа-носителя, л/мин | 0,91 |
| Диаметр отверстия устройства ввода, мм | 1,0 |
| Диаметр отверстия скиммера, мм | 0,8 |
| Напряжение на линзе ионов, В | 7,25 |
| Порог дискриминации, В | 70 |
| Разрешение, а.е.м. | 0,7 |
| Время интегрирования, мс | 300 |
| Время сканирования, с | 6 |
| Повторяемость | 3 |
| Скорость подачи образца  | 1,0 мл/мин |

Перед каждым рядом измерений проводится автоматическая настройка прибора.

Перед анализом испытуемого раствора анализируют стандартные растворы 1, 2, 3. Регистрируют результаты измерений. По результатам измерений стандартных растворов строят калибровочный график зависимости показаний, прибора (содержание кобальта) от концентрации цианокобаламина (мкг/мл). Затем анализируют испытуемый раствор и по калибровочному графику определяют содержание цианокобаламина (мкг) в 1 мл извлечения.

Содержание цианокобаламина (X) в одной таблетке в процентах от заявленного количества вычисляют по формуле:

Х=$\frac{C∙V\_{э}∙G∙100}{a\_{1}∙L∙1000}=\frac{C∙V\_{э}∙G}{a\_{1}∙L∙10}$,

где: С - концентрация цианокобаламина в испытуемом растворе, мг/мл;

Vэ - объем смеси кислот, используемый при приготовлении

 испытуемого раствора, мл;

a1 - масса навески образца, мг;

G - средняя масса таблетки, мг;

L - заявленное количество цианокобаламина в одной таблетке, мг.

1000 – пересчет миллиграмм, г.

*Цианокобаламин* (Альтернативная методика)⃰ Микробиологический метод. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение содержания витаминов в многокомпонентных препаратах микробиологическим методом», определение количественного содержания витаминов чашечным методом

*Магний.* Определение проводят методом атомно-абсорбционной спектрометрии в соответствии с ОФС «Атомно-абсорбционная спектрофотометрия».

*Испытуемый раствор*.Точную навеску растертых в порошок таблеток, эквивалентную около 780 мг магния, переносят в мерную колбу вместимостью 500 мл, прибавляют 50 мл смеси кислот (2 части хлористоводородной кислоты раствора 30 %, 1 часть азотной кислоты раствора 70 % и 1 часть воды очищенной) и выдерживают на водяной бане около 2 ч при температуре не менее 70 °С. После охлаждения до комнатной температуры доводят объем раствора водой до метки. 1,0 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 2 мл буферного раствора по Шинкелю (Цезий хлористый - лантан хлористый, буферный раствор по Шинкелю - Шукнехту, для атомно-абсорбционной спектроскопии, 10 g/l CsCl + 100 g/l LaCl), доводят водой до метки и перемешивают.

*Базовый стандартный раствор магния 1000 мкг.* Около 1,0 г (точная навеска) порошка металлического магния помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, растворяют в 50 мл хлористоводородной кислоты раствора 6 М, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. 1 мл полученного раствора содержит около 1000 мкг магния.

*Стандартный раствор 1 магния 5 мкг.* 1 мл базового стандартного раствора магния помещают в мерную колбу вместимостью 200 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. 1 мл полученного раствора содержит 5 мкг магния.

*Стандартный раствор 2 магния 20 мкг.* 2 мл базового стандартного раствора магния помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. 1 мл полученного раствора содержит 20 мкг магния.

Условия проведения анализа:

|  |  |
| --- | --- |
| Прибор | Атомно-абсорбционный спектрометр |
| Лампа  | лампы с полым катодом ЛПК, HСL  |
| Ток лампы | 3,0 мА |
| Длина волны | 202,6 нм |
| Щель | 0,2 нм |
| Корректировка базы | компенсация D2 |
| Тип пламени | Воздух/ацетилен 1,0 мг/л |
| Горелка | 5 см однощелевая горелка |
| Установка горелки (высота/угол) | -8/0° |
| Время измерения/число измерений | 4,0 сек/4 |
| Стандарт 1 | 5,0 мг/л |
| Стандарт 2 | 20,0 мг/л |

Перед каждым рядом измерений проводится калибровка.

Содержание магния (X) в одной таблетке в процентах от заявленного количества вычисляют по формуле:

Х=$\frac{A\_{T}∙C\_{R}∙0,5∙100∙Gˑ100}{A\_{R}∙a∙Lˑ1ˑ1000}=\frac{A\_{T}∙C\_{R}∙5∙G}{A\_{R}∙aˑL},$

где: At - показание прибора для испытуемого раствора;

*A*R - показание прибора для соответствующего стандартного раствора;

CR - концентрация магния в стандартном растворе 1 или 2, мкг/мл; а - масса навески образца, мг;

G- средняя масса таблетки, мг;

L - заявленное количество магния в одной таблетке, мг.

1000 – пересчет миллиграмм, г.

*Магний* (альтернативная методика)\* Определение проводят методом ИСП-МС (масс-спектрометрией с индуктивно связанной плазмой).

Определение проводят с помощью калибровочного графика, который строят для стандартного раствора магния в требуемом интервале концентраций.

*Испытуемый раствор*. Точную навеску растертых в порошок таблеток, эквивалентную около 72,71 мг магния, помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл смеси кислот и выдерживают на ультразвуковой бане 0,5 ч при температуре не менее 60 °С. После охлаждения до комнатной температуры доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. 5 мл полученного раствора переносят в центрифужную пробирку и центрифугируют при 2000 об/мин в течение 10 мин. Затем отбирают 2 мл надосадочной жидкости и переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

*Смесь кислот*. См. примечание 1 к разделу «Количественное определение. Цианокобаламин\*».

*Стандартный раствор 1 с содержанием магния 10 мкг/мл*. 1 мл Базового стандартного раствора магния с концентрацией 1000 мг/л помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают (раствор 1 — в 1 мл содержится 10 мкг магния).

*Стандартный раствор 2 с содержанием магния 20 мкг/мл*. 1 мл базового стандартного раствора магния с концентрацией 1000 мг/л помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают (раствор 2 — в 1 мл содержится 20 мкг магния).

*Стандартный раствор 3 с содержанием магния 30 мкг/мл*. 9 мл базового стандартного раствора магния с концентрацией 1000 мг/л помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, вносят 29,1 мл воды и перемешивают (раствор 3 — в 1 мл содержится 30 мкг магния)

Условия проведения анализа методом ИСП-МС приведены в разделе «Количественное определение. Цианокобаламин\*».

Перед анализом испытуемого раствора анализируют стандартные растворы 1, 2, 3. Регистрируют результаты измерений. По результатам измерений стандартных растворов строят калибровочный график зависимости показаний прибора от концентрации магния (мкг/мл). Затем анализируют испытуемый раствор и по калибровочному графику определяют содержание магния (мкг) в 1 мл извлечения.

Содержание магния (X) в одной таблетке в процентах от заявленного количества вычисляют по формуле:

Х=$\frac{C∙V\_{э}∙G∙100}{a\_{1}∙L ∙1000}=\frac{C∙V\_{э}∙G}{a\_{1}∙L ∙10}$,

где: С - концентрация магния в испытуемом растворе, мг/мл;

Vэ - объем смеси кислот, используемый при приготовлении

 испытуемого раствора, мл;

a1 - масса навески образца, мг;

G - средняя масса таблетки, мг;

L - заявленное количество магния в одной таблетке, мг.

1000 – пересчет миллиграмм, г.

*Цинк.* Определение проводят методом атомно-абсорбционной спектрометрии в соответствии с ОФС «Атомно-абсорбционная спектрометрия».

*Испытуемый раствор***.** Точную навеску растертых в порошок таблеток, эквивалентную около 117,6 мг цинка, переносят в мерную колбу вместимостью 500 мл, прибавляют 50 мл смеси кислот (2 части хлористоводородной кислоты раствора 30 %, 1 часть азотной кислоты раствора 70 % и 1 часть воды очищенной) и выдерживают на водяной бане около 2 часов при температуре не менее 70 °С. После охлаждения до комнатной температуры доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. 1,0 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 200 мл, доводят водой до метки и перемешивают.

*Базовый стандартный раствор* 1000 мкг *цинка*. Около 312,5 мг (точная навеска) цинка оксида помещают в мерную колбу вместимостью 250 мл, прибавляют 80 мл хлористоводородной кислоты раствора 6 М, нагревают до полного растворения. Затем охлаждают, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. 1 мл полученного раствора содержит около 1000 мкг цинка.

*Исходный стандартный раствор 10 мкг цинка.* 1 мл базового стандартного раствора цинка помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. 1 мл полученного раствора содержит 10 мкг цинка.

*Стандартный раствор 1 с содержанием 5 мкг цинка*. 10 мл исходного стандартного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 200 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. 1 мл полученного раствора содержит 0,5 мкг цинка.

*Стандартный раствор 2 с содержанием 2 мкг цинка*. 20 мл исходного стандартного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. 1 мл полученного раствора содержит 2,0 мкг цинка

Условия проведения анализа:

|  |  |
| --- | --- |
| Прибор | Атомно-абсорбционный спектрометр |
| Лампа  | лампы с полым катодом ЛПК, НСL  |
| Ток лампы | 7,5 мА |
| Длина волны | 213,9 нм |
| Щель | 0,5 нм |
| Корректировка базы | компенсация D2 |
| Тип пламени | Воздух/ацетилен 1,1 л/мин |
| Горелка | 5 см однощелевая горелка |
| Установка горелки (высота/угол) | -8/30° |
| Время измерения/число измерений | 4,0 сек/3 |
| Стандарт 1 | 0,5 мг/л |
| Стандарт 2 | 2,0 мг/л |

Перед каждым рядом измерений проводится калибровка.

Содержание цинка (X) в одной таблетке в процентах от заявленного количества вычисляют по формуле:

Х=$\frac{A\_{T}∙C\_{R}∙0,5∙200∙Gˑ100}{A\_{R}∙a∙Lˑ1ˑ1000}=\frac{A\_{T}∙C\_{R}∙10∙G}{A\_{R}∙aˑL},$

где: At - показание прибора для испытуемого раствора;

*A*R - показание прибора для соответствующего стандартного раствора;

CR - концентрация цинка в стандартном растворе 1 или 2, мкг/мл;

а - навеска растертых в порошок таблеток, в мг;

G- средняя масса таблетки, мг;

L - заявленное количество цинка в одной таблетке, мг.

1000 – пересчет миллиграмм, г.

*Цинк*(альтернативная методика)\* Определение проводят методом ИСП-МС.

Определение проводят с помощью калибровочного графика, который строят для стандартного раствора цинка в требуемом интервале концентраций.

*Испытуемый раствор*. Точную навеску растертых в порошок таблеток, эквивалентную около 13,64 мг цинка переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл смеси кислот и выдерживают на ультразвуковой бане около 0,5 ч при температуре не менее 60 °С. После охлаждения до комнатной температуры доводят объем раствора водой до метки. 10 мл полученного раствора переносят в центрифужную пробирку и центрифугируют при 2000 об/мин в течение 10 мин. Отбирают 5 мл надосадочной жидкости и переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят водой до метки и перемешивают.

*Смесь кислот.* См. примечание 1 к разделу «Количественное определение. Цианокобаламин\*».

*Стандартный раствор 1 с содержанием цинка 20 мкг/мл.* 1 мл стандартного раствора цинка с концентрацией 1000 мг/л помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают (раствор 1 — в 1 мл содержится 20 мкг цинка).

*Стандартный раствор 2 с содержанием цинка 30 мкг/мл.* 9 мл стандартного раствора цинка с концентрацией 1000 мг/л помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, вносят 29,1 мл воды и перемешивают (раствор 2 — в 1 мл содержится 30 мкг цинка).

*Стандартный раствор 3 с содержанием цинка 40 мкг/мл.* 1 мл стандартного раствора цинка с концентрацией 1000 мг/л помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают (раствор 3 — в 1 мл содержится 40 мкг цинка).

Условия проведения анализа методом ИСП-МС приведены в разделе «Количественное определение. Цианокобаламин\*».

Перед анализом испытуемого раствора анализируют стандартные растворы 1, 2, 3. Регистрируют результаты измерений. По результатам измерений стандартных растворов строят калибровочный график зависимости показаний прибора от концентрации цинка (мкг/мл). Затем анализируют испытуемый раствор и по калибровочному графику определяют содержание цинка (мкг) в 1 мл извлечения.j

Содержание цинка (X) в одной таблетке в процентах от заявленного количества вычисляют по формуле:

Х=$\frac{C∙V\_{э}∙G∙100}{a\_{1}∙L ∙1000}=\frac{C∙V\_{э}∙G}{a\_{1}∙L ∙10}$,

где: С - концентрация цинка в испытуемом растворе, мг/мл;

Vэ - объем смеси кислот, используемый при приготовлении

 испытуемого раствора, мл;

a1 - масса навески образца, мг;

G - средняя масса таблетки, мг;

L - заявленное количество цинка в одной таблетке, мг.

1000 – пересчет миллиграмм, г.

Селен. Определение проводят методом атомно-абсорбционной спектрометрии.

 *Испытуемый раствор.* Точную навеску растертых в порошок таблеток, эквивалентную около 543.3 мкг селена помещают в коничес1сую колбу, прибавляют около 12 мл азотной кислоты раствора 70 %, осторожно вращают, чтобы получить дисперсию, обрабатывают ультразвуком в течение 10 мин до полного растворения. Осторожно кипятят около 15 мин, охлаждают до комнатной температуры, осторожно прибавляют 8 мл хлорной кислоты 30 %, нагревают до появления паров хлорной кислоты, и затем перемешивают до исчезновения этих паров. Повторяют последнюю процедуру несколько раз. Охлаждают до комнатной температуры, с помощью растворителя переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят растворителем до метки и перемешивают

*Исходный стандартный раствор селена 1000 мкг/ мл.*  Около 1 г (точная навеска) металлического селена растворяют в минимальном количестве азотной кислоты, упаривают досуха, прибавляют 2 мл воды и еще раз упаривают досуха (процедуру повторяют несколько раз). Остаток растворяют в хлористоводородной кислоте растворе 3 М, переносят в мерную колбу вместимостью 1000 мл, доводят хлористоводородной кислотой раствором 3 М до метки и перемешивают. Концентрация селена в, растворе — около 1000 мкг/мл.

*Стандартные растворы селена.* 10,0 мл исходного раствора селена переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят водой до метки. В три отдельные мерные колбы вместимостью 100 мл пипеткой переносят 5,0; 10,0 и, 25 мл полученного раствора, в каждую, колбу прибавляют по 5,0 мл хлорной кислоты, осторожно кипятят 15 мин, охлаждают и доводят растворителем до метки. Концентрация селена в стандартных растворах — 5,0, 10,0 и 25,0 мкг, соответственно.

Условия проведения анализа:

|  |  |
| --- | --- |
| Прибор | Атомно-абсорбционный спектрометр |
| Лампа  | лампы с полым катодом ЛПК, HСL  |
| Ток лампы | 7,5 мА |
| Длина волны | 196 нм |
| Щель | 0,5 нм |
| Корректировка базы | компенсация D2 |
| Тип пламени | Воздух/ацетилен 1,1 л/мин |
| Горелка | 5 см однощелевая горелка |
| Установка горелки (высота/угол) | -8/30° |
| Время измерения/число измерений | 4,0 сек/3 |
| Стандарт 1 | 0,5 мг/л |
| Стандарт 2 | 2,0 мг/л |

Измеряют поглощение стандартных растворов (для построения калибровочной прямой) и сразу после этого, не меняя настройки прибора, измеряют поглощение испытуемого раствора при длине волны, соответствующей эмиссии для селена. В качестве раствора сравнения используют смесь растворителя с хлорной кислотой (20 : 1 по объему).

Строят калибровочную прямую для селена и по ней определяют концентрацию селена в испытуемом растворе в мкг/мл (Cr).

Содержание селена (X) в одной таблетке в процентах от заявленного количества вычисляют по формуле:

Х=$\frac{C\_{R}∙50∙G·100}{a·Lˑ10^{6}}=\frac{C\_{R}∙G·}{a·200},$

где: СR – концентрация селена в испытуемом растворе, определенная по

калибровочному графику, мкг/мл;

а - навеска растертых в порошок таблеток, мг;

G - средняя масса таблетки, в мг;

L - заявленное количество селена в одной таблетке, мг.

106 – пересчет микрограмм, г.

*Селен* (альтернативная методика)⃰ Определение проводят методом ИСП-МС. Определение проводят с помощью калибровочного графика, который строят для стандартного раствора селена в требуемом интервале концентраций.

*Испытуемый раствор*. Точную навеску растертых в порошок таблеток, эквивалентную около 90,545 мкг селена помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл смеси кислот и выдерживают на ультразвуковой бане 0,5 ч при температуре не менее 60 °С. После охлаждения до комнатной температуры доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Осадок отделяют центрифугированием при 6000 об/мин, надосадочную жидкость фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор 0,20 - 0,45 мкм.

*Смесь кислот.* См. примечание 1 к разделу «Количественное определение. Цианокобаламин».

*Исходный стандартный А раствор селена.* Около 50 мг (точная навеска) металлического селена помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 20 мл смеси кислот и выдерживают на ультразвуковой бане 0,5 ч при температуре не менее 60 °С.

После охлаждения до комнатной температуры доводят объем раствора водой до метки (раствор А — в 1 мл содержится 1000 мкг селена).

*Стандартный раствор 1 с содержанием* селена *1 мкг.* 1 мл раствора А переносят в мерную колбу вместимостью 1000 мл и доводят водой до метки (раствор 1 — в 1 мл содержится 1 мкг селена).

*Стандартный раствор 2 с содержанием селена 1,5 мкг*. 0,9 мл раствора А переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл, вносят 29,1 мл воды очищенной и перемешивают. 10 мл этого раствора переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят водой до метки и перемешивают.

50 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят водой до метки и перемешивают (раствор 2 — в 1 мл содержится 1,5 мкг селена).

*Стандартный раствор 3 с содержанием селена 2 мкг*. 1,0 мл раствора А переносят в мерную колбу вместимостью 500 мл, доводят водой очищенной до метки и перемешивают (раствор 3 — в 1 мл содержится 2 мкг селена).

Условия проведения анализа методом ИСП-МС приведены в разделе «Количественное определение цианокобаламина».

Перед анализом испытуемого раствора анализируют стандартные растворы 1, 2, 3. Регистрируют результаты измерений. По результатам измерений стандартных растворов строят калибровочный график зависимости показаний прибора от концентрации селена (мкг/мл). Затем анализируют испытуемый раствор и по калибровочному графику определяют содержание селена (мкг) в 1 мл извлечения.

Содержание селена (X) в процентах в одной таблетке вычисляют по формуле:

Х= $\frac{С∙V\_{Э}∙G∙100}{a\_{1}·Lˑ1000}=\frac{С∙V\_{Э}∙G∙}{a\_{1}·Lˑ10}∙$

где: С - концентрация селена в испытуемом растворе, мг/мл;

Vэ - объем смеси кислот, используемый при приготовлении

испытуемого раствора, мл;

a1 - масса навески образца, мг;

G- средняя масса таблетки, мг;

L - заявленное количество селена в одной таблетке, мг.

**Хранение.** В сухом защищенном от света месте при температуре не выше 25 °С. В соответствии с ОФС «Хранение лекарственных средств».