МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |  |
| --- | --- |
| **Аскорбиновая кислота + Биотин + Кальция пантотенат + Никотинамид + Пиридоксина гидрохлорид + Рибофлавин + Тиамина нитрат + Фолиевая кислота + Цианокобаламин + Кальций + Магний + Цинк, таблетки** ***Acidum ascorbicum + Biotinum + Calcium pantotenas + Nicotinamidum + Pyridocxini hydrochloridum + Riboflavinum + Thiamini nitras + Acidum folicum+ Cyanocobalaminum + Calcium +Magnesium + Zincum, tabulettae***  |  **ФС**  **Вводится впервые** |

 Настоящая фармакопейная статья распространяется на лекарственный препарат Аскорбиновая кислота + Биотин + Кальция пантотенат + Никотинамид + Пиридоксина гидрохлорид + Рибофлавин + Тиамина нитрат + Фолиевая кислота + Цианокобаламин + Кальций + Магний + 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 95 % и не более 120 % аскорбиновой кислоты C6H8O6; не менее 85 % и не более 130 % биотина С10H88N2O3S; не менее 100 % и не более 130 % кальция пантотената C18H32CaN2O10; не менее 90 % и не более 120 % никотинамида С6Н6N2O; не менее 90 % и не более 120 % пиридоксина гидрохлорида C8H11NO3·HCI; не менее 90 % и не более 120 % рибофлавина C17H20N4O6;не менее 85 % и не более 120 % тиамина нитрат C12H17N4OSˑNO3; не менее 90 % и не более 135 % фолиевой кислоты C₁₉H₁₉N₇O₆; не менее 85 % и не более 130 % цианокобаламина C63H88CoN14O14P; не менее 95 % и не более 105 % кальция (в форме кальция карбоната и кальция пантотената); не менее 95 % и не более 105 % магния (в форме магния гидроксикарбоната и магния оксида); не менее 90 % и не более 110 % цинка (в форме цинка цитрата тригидрата).

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 тиамина нитрата, пиридоксина гидрохлорида, никотинамида, кальция пантотената, рибофлавина, аскорбиновой кислоты, фолиевой кислоты должны соответствовать по времени удерживания соответствующим пикам на хроматограммах стандартных растворов.

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

Наличие абсорбции испытуемых растворов ирастворов СО кальция, магния, цинка должна быть одного порядка при длинах волн

# *Условия детектирования*

# Лампа: с полым электродом из соответствующего микроэлемента

#  Горелка 5 см

#  Ширина щели (мм): 1,8/0,6

#  Пламя: Воздух/ацетилен

Длина волны:

Последовательно определяют поглощение стандартных растворов:

|  |  |
| --- | --- |
| Эмиссионная длина волны | Показатель, нм |
| кальция | - 422,7  |
| магния | - 285,2  |
| цинка | - 213,8  |

 *Биотин,**Цианокобаламин.* Микробиологический метод.

Активность испытуемого раствора к тест - культуре должна соответствовать активности стандартного раствора к тест - культуре Определение проводят по разделу «Количественное определение» в соответствии с ОФС «Определение содержания витаминов в многокомпонентных препаратах микробиологическим методом».

**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**

*Тиамина нитрат, Пиридоксина гидрохлорид, Никотинамид, Кальция пантотенат, Рибофлавин*. Определение проводят методом ВЭЖХ. При проведении анализа испытуемый и стандартный растворы необходимо защищать от света и атмосферного воздействия и использовать лабораторную посуду из нейтрального стекла.

*Испытуемый раствор.* Точная навеска порошка растертых таблеток, эквивалентная по содержанию 2,86 мг тиамина нитрата, 1,35 мг пиридоксина гидрохлорида, 6,76 мг никотинамида, 3,11 мг кальция пантотената, 2,03 мг рибофлавина помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют около 50 мл фосфорной кислоты раствора 0,2 %, взбалтывают, нагревают при температуре 70 — 80 °С в течение 10 - 20 мин, охлаждают раствор до комнатной температуры, доводят объем раствора тем же растворителем до метки, перемешивают и фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм.

*Стандартный раствор.* Около 22 мг (точная навеска) стандартного образца (СО) тиамина нитрата, около 21 мг (точная навеска) СО рибофлавина, около 71 мг (точная навеска) СО никотинамида, около 37 мг (точная навеска) СО кальция пантотената, около 14 мг (точная навеска) СО пиридоксина гидрохлорида и около 740 мг (точная навеска) СО аскорбиновой кислоты помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в фосфорной кислоте растворе 0,2 % при энергичном перемешивании, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают. 1 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят объем раствора фосфорной кислоты раствором 0,2 % до метки и перемешивают. Затем раствор фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм.

Концентрация тиамина нитрата ≈ 0,022 мг/ мл,

Концентрация рибофлавина ≈ 0,021 мг/ мл,

Концентрация никотинамида ≈ 0,071 мг/ мл,

Концентрация кальция пантотената ≈ 0,037 мг/ мл,

Концентрация пиридоксина гидрохлорида ≈ 0,014 мг/ мл,

Концентрация аскорбиновой кислоты ≈0,74 мг/ мл

*Подвижная фаза:* натрия дигидрофосфата раствор 0,05 М pH 2,6 - Ацетонитрил 1 : 1 (объем/объем).

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка: | 250 х 4,6 мм, сорбент: октадецилсиликагель с блокированными концевыми группами (С18) с диаметром частиц 5 мкм. Допускается использование аналогичных колонок, удовлетворяющих требованиям пригодности хроматографической системы |
| Температура колонки:  | 25 °С |
| Детектор: | Ультрафиолетовый  |
| Длина волны детектирования | УФ, 205 ,268, 292 |
| Объем пробы: | 20 мкл |
| Скорость потока: | 1,0 мл/мин |

Время хроматографирования - 12 мин;

Режим хроматографического разделения - градиентный:

Относительные времена удерживания и длины волн детектирования (при указанных рабочих условиях и указанном оборудовании)

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Пики | Относительные времена удерживания (относительно нико­тинамида) | Длины волн детек­тирования, нм |
| Тиамина нитрат | около 0,5 | 268  |
| Аскорбиновая кислота | около 0,7 | 268  |
| Никотинамид | около 1,0 | 268  |
| Пиридоксина гидрохлорид | около 1,5 | 292  |
| Кальция пантотенат | около 1,9 | 205  |
| Рибофлавин | около 2,2 | 268  |

Градиент подвижной фазы:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Время (мин) | Ацетонитрил (% объём/объём) | 0,05М раствор натрия фосфата однозамещенного (% объём/объём) |
| 0  | 0 | 100 |
| 5,0 | 0 | 100 |
| 20,0 | 40 | 60 |
| 23,0 | 40 | 60 |

*Проверка пригодности хроматографической системы.*

По 20 мкл испытуемого раствора и стандартного раствора попеременно хроматографируют на жидкостном хроматографе, получая не менее 3 хроматограмм для каждого из растворов.

Система считается пригодной если выполняются следующие требования:

* Фактор асимметрии пика каждого из компонентов должен составлять 0,8 - 1,5.
* Разрешение между пиками тиамина нитрата и аскорбиновой кислотой должно быть не менее 4,0.
* Максимальное допустимое относительное стандартное отклонение площади пика определяемого соединения для повторных вводов в колонку стандартного раствора не превышает величин, указанных ниже:

|  |
| --- |
| Количество отдельных инъекций |
|  | 3 | 4 | 5 | 6 |
| Р % Максимальное допустимое относительное стандартное отклонение |
|  4,0 | 0,83 | 1,12 | 1,46 | 1,7 |

Метод внешнего стандарта

Содержание тиамина нитрата, рибофлавина, никотинамида, кальция пантотената, пиридоксина гидрохлорида (Х) водной таблетке в процентах от заявленного количества вычисляют по формуле:

Х=$\frac{S∙C\_{0}∙100∙G∙P·100}{S\_{0}∙a∙Lˑ100·1000}=\frac{S∙C\_{0}∙G∙P}{S\_{0}∙a∙Lˑ10}$,

где: S - площадь пика тиамина нитрата (рибофлавина, никотинамида,

кальция пантотената, пиридоксина гидрохлорида) на хроматограмме испытуемого раствора;

So - площадь пика тиамина нитрата (рибофлавина, никотинамида,

кальция пантотената, пиридоксина гидрохлорида) на хроматограмме стандартного раствора;

Со - концентрация тиамина нитрата (рибофлавина, никотинамида,

кальция пантотената, пиридоксина гидрохлорида) в стандартном растворе, мг/мл;

а - навеска порошка таблеток, взятая для анализа, мг;

G - средняя масса таблетки, мг;

Р - содержание тиамина нитрата (рибофлавина, никотинамида, кальция

пантотената, пиридоксина гидрохлорида) в стандартном образце, %;

L - заявленное количество тиамина нитрата (рибофлавина,

никотинамида, кальция пантотената, пиридоксина гидрохлорида) в

одной таблетке, мг.

1000 – пересчет миллиграммы, г.

*Фолиевая кислота.* Метод ВЭЖХ.

*Буферный раствор*. В мерную колбу вместимостью 1000 мл, содержащую воду, помещают 8,0 г натрия перхлората, 45 г натрия гидрофосфата дигидрата и 5 г калия дигидрофосфата, перемешивают и доводят объём раствора водой до метки. pH раствора доводят до 10 аммиака концентрированным раствором.

*Натрия ацетата раствор*. В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 820 мг безводного натрия ацетата, растворяют в воде, доводят pH до 3,0 уксусной кислотой ледяной, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

*Испытуемый раствор.* Точную навеску порошка растертых таблеток, эквивалентную около 0,17 мг фолиевой кислоты помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в буферном растворе, доводят объем раствора буферным раствором до метки, перемешивают и фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм. (Концентрация фолиевой кислоты 0,0125 мг/мл).

*Стандартный раствор.*  Около 55 мг (точная навеска) СО фолиевой кислоты помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в буферном растворе, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают. 1 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора буферным раствором до метки, перемешивают, фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм.

*Подвижная фаза*: Натрия ацетата раствор - ацетонитрил 90 : 10 (% об.)

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка: | 150 х 4,6 мм, сорбент: октадецилсиликагель с блокированными концевыми группами (С18) с диаметром частиц 3 мкм.  |
| Температура колонки:  | 18 - 25 °С |
| Детектор: | Ультрафиолетовый,  |
| Длина волны детектирования | УФ, 282 нм |
| Объем пробы: | 20 мкл |
| Скорость потока:Время удерживания | 1,0 мл/мин7,5 мин |

Режим хроматографического разделения - градиентный:

*Проверка пригодности хроматографической системы*

Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются сле­дующие требования:

* Фактор асимметрии пика фолиевой кислоты находится между 0,8 и 1,5
* Максимально допустимое относительное стандартное отклонение площади пика определяемого соединения для повторных вводов в колонку стандартного раствора не должно превышать величин, указанных ниже:

|  |
| --- |
| Число индивидуальных вводов |
|  | 3 | 4  | 5 | 6 |
| Р % | Максимально допустимое относительное стандартное отклонение |
| 4,0 | 0,83 | 1,12  | 1,46 | 1,70 |

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

ХФ=$\frac{S∙C\_{0}∙25∙G∙P∙100}{S\_{0}∙a∙Lˑ100·1000}=\frac{S∙C\_{0}∙G∙P}{S\_{0}∙a∙Lˑ40}$,

где: S - площадь пика фолиевой кислоты на хроматограмме испытуемого

 раствора;

So - площадь пика фолиевой кислоты на хроматограмме стандартного

раствора;

Со - концентрация фолиевой кислоты в стандартном растворе, мг/мл;

a - навеска порошка таблеток, взятая для анализа, мг;

G - средняя масса одной таблетки, мг;

Р - содержание стандартного образца фолиевой кислоты, %;

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

1000 - пересчет миллиграмм, г.

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

*Испытуемый раствор*. Последовательно переносят 10 таблеток в мерную колбу вместимостью 1000 мл, содержащую около 500 мл воды. Прибавляют 100 мл аммиака раствора 2 % и 100 мл натрия тиосульфата раствора 5 г/л воды. В случае необходимости можно использовать раствор полисорбата 80 или SAM раствор (содержащий ацетон и серную кислоту).

Обрабатывают ультразвуком в течение 3 мин, выдерживают в течение 15 мин, периодически покачивая колбу, и доводят объем раствора до метки водой. Затем готовят разведения с концентрацией (2,42 - 3,03) 10-5 таблетка/мл.

Теоретическое содержание D(+)-биотина этого раствора составляет (4,0 - 6,0) 10-3 мкг/мл.

Готовят следующие разведения: 10 мл полученного раствора разводят до 250 мл водой и снова 10 мл последнего раствора разводят до 150 мл водой.

*Стандартный раствор*. Около 54,0 мг (точная навеска) стандартного образца D(+)-биотина помещают в мерную колбу вместимостью 500 мл, содержащую небольшое количество воды. Прибавляют 1 мл аммиака раствора 2 % и 250 мл этанола 25 % и доводят до 500 мл водой при температуре 20 °С. Полученный раствор содержит в 1 мл 1,08.10-1 мг D(+)-биотина/мл. Раствор хранят при температуре 2 - 8 °С в тёмном месте, в течение 3 мес.

Для ежедневного использования переносят 30 мл раствора натрия тиосульфата 0,5 % в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 5 мл основного раствора при температуре (20 °С), доводят раствор водой до метки и перемешивают. Готовят, используя в качестве растворителя воду, следующие разведения: 5 мл до 150 мл и снова 5 мл до 200 мл. Полученный стандартный раствор содержит в 1 мл 4,5.10 -3 мкг D(+)-биотина.

*Тест-микроорганизм и основная культура*

Переносят Lactobacillus plantarum ВКМ В-578 (АТСС 8014) на скошенный агар в 10 мл жидкой питательной среды для анализа биотина. Пересев делают один раз в месяц; после инкубации при температуре 35 - 37 °С в течение 20 - 24 ч., хранят при температуре 2 - 8 °С. Вторую аналогичную основную культуру пересевают только один раз в три месяца и хранят в качестве резервной.

Инокулят

а) Платиновой петлёй переносят микроорганизм с посева на скошенном агаре в 7,5 мл жидкой питательной среды для инокуляции в пробирке (1 полная петля). Инкубируют эту культуру при температуре 35 - 37 °С в течение около 18 - 24 ч.

В суспензии должна наблюдаться фаза экспотенциального роста микроорганизма, а поглощение должно составлять около 1,0 при 570 нм. Клетки центрифугируют и промывают трижды натрия хлорида раствором 0,9 %. Суспендируют и натрия хлорида раствором 0,9 % доводят поглощение до 1,0. Конечный инокулят получают разведением 1 : 200 тем же самым натрия хлорида раствором 0,9 %.

б) Альтернативно, можно приготовить 2 - годичный запас инокулята и хранить его в жидком азоте. Готовят необходимое количество пробирок с жидкой питательной средой для инокуляции. Продолжительность инкубации при температуре 35 - 37 °С составляет около 16 - 24 ч. После инкубации проводят контроль поглощения; поглощение должно составлять более 0,5 при 570 нм. Культуру центрифугируют и промывают дважды натрия хлорида раствором 0,9 % и последний раз питательной средой для анализа биотина двойной концентрации (7,5 г/100 мл). Суспендируют в той же самой питательной среде, объединяют полученные суспензии клеток в колбе Эрленмейера и перемешивают и доводят поглощение при 570 нм до 1,0. Количество клеток в суспензии составляет около 106 - 108 КОЕ/мл суспензии. Проводят подсчёт клеток в этой суспензии. Для определения количества клеток используют питательную среду для цитометрии.

Используют криопробирки в боксе с ламинарным потоком воздуха. С соблю­дением асептических условий переносят 1,25 мл клеточной суспензии в каждую пробирку, используя для этого шприц. Пробирки закрывают пробками и сразу же замораживают в жидком азоте. Через 15 дней эту суспензию необходимо валидировать.

Для проверки через 24 ч. размораживают 2 пробирки на водяной бане при температуре 37 °С. Определяют количество клеток в каждой пробирке. Количество клеток не должно быть значительно ниже, чем перед замораживанием. Дополнительно записывают кривую ответа в зависимости от дозы биотина и сравнивают с кривой, построенной для свежего инокулята или валидированного замороженного препарата. В одной пробирке проверяют микробиологическую чистоту суспензии и устанавливают подлинность микроорганизма.

Для использования из жидкого азота достают 1 пробирку, размораживают на водяной бане при температуре 37 °С и готовят разведение 1 : 200 натрия хлорида раствором 0,9 %.

Примечание

Предосторожности: при работе с жидким азотом и размораживании пробирок следует использовать защитные очки и перчатки.

Переносят по 0,1 мл воды в 2 контрольные пробирки. Затем последовательно с помощью микропипеток переносят 0,1 мл и 0,2 мл порции полученных стандартных и испытуемых растворов в каждую из 2 пробирок. Повторно проводят тест со вторым штативом пробирок. Диспенсором прибавляют 9,9 мл порции жидкой питательной среды для теста – среда для анализа биотина в каждую пробирку.

Эти операции могут проводится автоматически.

Таким образом получают по 4 тест - пробирки, каждая из которых по отдельности содержит стандартный раствор и испытуемый раствор с 4,5 10-5  и 9ˑ10-5 мкг D(+)-биотина в мл, и 4 контрольных пробирки.

Затем пробирки закрывают пробкой, чтобы предупредить бактериальное за­грязнение, и стерилизуют в автоклаве при температуре 110 – 115 °С в течение 10 - 15 мин. После автоклавирования пробирки охлаждают на водяной бане, в защищенном от света месте. После охлаждения пробирки инокулируют (за исключением первых 2 пробирок в каждом штативе) 0,5 мл инокулята. Инкубируют на водяной бане при температуре 30 - 37 °С, которую поддерживают постоянной в пределах ± 0,5 °С в течение 16 - 24 ч. После инкубации рост бактерий прекращают путём нагревания каждой пробирки в течение 15 мин при температуре 90 °С (минимум). Далее пробирки энергично встряхивают. Настраивают фотометр с использованием неинокулированного контроля при 570 нм, чтобы пропускание составляло 1,000, затем проводят измерение мутности (поглощения) раствора в пробирках.

Используют соответствующий метод для расчёта активности (например, метод по 4 точкам, факториальный метод и т.д.).

Критерий допустимости:

Если при использовании подходящего статистического теста (Груба, Диксона) среди стандартных результатов измерения поглощения обнаружится выпадающее значение, то это показание следует заменить средней величиной других значений.

Величины, полученные для стандартов, должны находиться в пределах 80 - 120 %.

Если показания поглощения любых двух образцов из одного и того же штатива имеют значимое различие, то выпадающее значение следует заменить другим показанием из этого же штатива. Если в штативе было скорректировано одно показание, то нельзя проводить корректировку для этого же испытуемого раствора из другого штатива.

Различие между результатами каждого штатива должно быть меньше чем или равно 15 %.

Примечания

Для того чтобы защитить биотин от продуктов фотолиза рибофлавина во время приготовления испытуемого раствора добавляют раствор натрия тиосульфата и доводят pH до 9. Также работы не проводят при ярком освещении. При разведении стандартного раствора добавляют раствор натрия тиосульфата по аналогии.

Вместо жидкого азота можно использовать морозильную камеру при 80 °С.

 *SAM раствор.* 650 мл ацетона, 50 мл серной кислоты раствора 2 М, 300 мл воды.

*Цианокобаламин.* Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение содержания витаминов в многокомпонентных препаратах микробиологическим методом». Определение количественного содержания витаминов чашечным методом или иным валидированным методом.

Микробиологический метод определение количественного содержания витаминов пробирочным методом.

Тест-микроорганизм и основная культура.

Переносят Lactobacillus leichmannii CIP 53,61 на скошенный агар в 10 мл жидкой питательной среды для основной культуры. Пересев делают один раз в месяц; после инкубации при 35-37 °С в течение 20-24 ч., хранят при 2-8 °С. Вторую аналогичную основную культуру пересевают только один раз в три месяца и хранят в качестве резервной.

Инокулят

а) Платиновой петлёй переносят микроорганизм с посева на скошенном агаре в 7,5 мл жидкой питательной среды для инокулята в пробирке (1 полная петля) и инкубируют при температуре 35 - 40 °С в течение 16 - 24 ч.

Суспензия должна находится в фазе экспоненциального роста и иметь по­глощение около 0,7 при 570 нм. Клетки центрифугируют и промывают их три раза натрия хлорида раствором 0,9 %. Суспендируют клетки и натрия хлорида раствором 0,9 % доводят поглощение до 1,0. Окончательное разведение получают в результате разведения 1:200 тем же натрия хлорида раствором 0,9 %.

б) Альтернативно, можно приготовить 2-годичный запас инокулята и хранить его в жидком азоте.

Готовят необходимое количество пробирок с жидкой питательной средой. Продолжительность инкубации при температуре 35 - 40 °С составляет около 16 - 24 ч. После инкубации проводят контроль поглощения; поглощение должно составлять более 0,7 при 570 нм. Культуру центрифугируют и промывают дважды натрия хлорида раствором 0,9 % и последний раз питательной средой для анализа цианокобаламина – раствор для промывания двойной концентрации (8,5 г/100 мл). Суспендируют в той же самой питательной среде, объединяют полученные суспензии клеток в колбе Эрленмейера, перемешивают и доводят поглощение при 570 нм до 1,0. Количество клеток в суспензии должно составлять более 104 КОЕ/мл суспензии. Проводят подсчёт клеток в этой суспензии. Для определения количества клеток используют питательную среду для цитометрии

Используют стерильные криопробирки в боксе с ламинарным потоком воздуха. С соблюдением асептических условий шприцом переносят 1,25 мл клеточной суспензии в каждую пробирку. Пробирки закрывают пробками и сразу же замораживают в жидком азоте. Через 15 дней эту суспензию необходимо валидировать.

Для проверки через 24 ч размораживают 2 пробирки на водяной бане при температуре 37 °С. Определяют количество клеток в каждой пробирке. Количество клеток не должно быть значительно ниже, чем перед замораживанием. Дополнительно записывают кривую ответа в зависимости от дозы цианокобаламина и сравнивают с кривой, построенной для свежего инокулята или валидированного замороженного препарата. В одной пробирке проверяют микробиологическую чистоту суспензии и устанавливают подлинность микроорганизма. Для использования достают одну пробирку из жидкого азота, размораживают на водяной бане при температуре 37 °С и готовят разведение 1:200 натрия хлорида раствором 0,9 %.

Предосторожности: при работе с жидким азотом и размораживании пробирок следует использовать защитные очки и перчатки.

*Испытуемый раствор.* Последовательно переносят 10 таблеток в мерную колбу вместимостью 1000 мл, содержащую около 500 мл воды. Прибавляют 150 мл буферного раствора (pH 5,3) и 120 мл SAM раствора. Обрабатывают ультразвуком в течение 3 мин и далее дают отстояться в течение 10 - 15 мин, периодически покачивая колбу. Доводят объём водой до метки, перемешивают и далее разводят водой для получения концентрации (6,36 - 7,27)10-5 таблетка/мл. Теоретическое содержание цианокобаламина в 1 мл этого раствора составляет около (7,0 - 9,0)ˑ10-4 мкг/мл.

Готовят следующие разведения: 25 мл полученного раствора разводят до 300 мл водой и снова 25 мл последнего раствора до 300 мл водой.

*Стандартный раствор*. Около 67,5 мг (точная навеска) стандартного образца цианокобаламина помещают в мерную колбу вместимостью 500 мл, содержащую небольшое количество воды. Прибавляют 250 мл этанола 25 %, поддерживая температуру 20 °С, доводят объём раствора водой до метки и перемешивают. Основной раствор содержит в 1 мл около 1,35ˑ10-1 мг цианокобаламина.

Раствор хранят в тёмном месте при температуре 2 - 8 °С, в течение 3 мес.

При использовании основной раствор нагревают до 20 °С и разводят до по­лучения концентрации 7 - 9ˑ10-4 мкг/мл цианокобаламина.

Готовят, например, следующие разведения водой 5 мл до 500 мл, затем 5 мл до 150 мл и снова 5 мл до 300 мл.

Методика

Переносят по 0,1 мл воды в 2 контрольные пробирки. Затем последовательно с помощью микропипеток переносят 0,1 мл и 0,2 мл порции всех стандарт­ных и испытуемых растворов в 2 пробирки каждый. Повторно проводят тест со вторым штативом пробирок. Диспенсором добавляют 9,9 мл жидкой пита­тельной среды в каждую пробирку.

Эти операции могут проводится автоматически.

Таким образом получают 4 тест - пробирки, каждая из которых по отдельности содержит каждый стандарт и испытуемый раствор с 7,5 10-6 и 1,5 10-5 мкг цианокобаламина в мл, и 4 контрольных пробирки.

После того как приготовлены разведения в обоих штативах, пробирки накрывают, чтобы предотвратить бактериальное загрязнение, и стерилизуют в автоклаве при температуре 110 - 115°С в течение 10 - 15 мин.

После автоклавирования пробирки охлаждают на водяной бане, защищают от света.

Затем пробирки инокулируют (за исключением первых 2 пробирок в каждом штативе) 0,5 мл инокулята. Инкубируют на водяной бане при температуре 40 °С , которую поддерживают постоянной в пределах ± 0,5 °С в течение 16 - 24 ч. После инкубации рост бактерий прекращают путём нагревания каждой пробирки в течение 15 мин при температуре 90 °С (минимум). Далее пробирки энергично встряхивают. Настраивают фотометр с использованием неинокулированного контроля при 570 нм, чтобы пропускание составляло 1,000, после чего проводят измерение поглощения раствора в пробирках.

Расчёт

Используют соответствующий метод для расчёта активности (например, ме­тод по 4 точкам, факториальный метод и т.д.).

*Критерий допустимости*

Если при использовании подходящего статистического теста (Груба, Диксона) среди стандартных результатов измерения поглощения обнаружится выпадающее значение, то это показание следует заменить средней величиной других значений.

Величины, полученные для стандартов, должных находиться в пределах 80 – 120 %.

Если показания поглощения любых двух образцов из одного и того же шта­тива имеют значимое различие, то выпадающее значение следует заменить другим показанием из этого же штатива. Если в штативе было скорректировано одно показание, то нельзя проводить корректировку для этого же испытуемого раствора из другого штатива.

Различие между результатами каждого штатива должно быть меньше чем или равно 15 %.

Допускается использование других питательных сред при условии, что их характеристики по крайней мере эквивалентны.

*Аскорбиновая кислота.* Определение проводят титриметрическим методом.

Количественное определение аскорбиновой кислоты проводят методом по­тенциометрического титрования йодом. Растворы готовят непосредственно перед употреблением.

*Испытуемый раствор.* Точную навеску порошка растертых таблеток, эквивалентную около 50,74 мг аскорбиновой кислоты помещают в коническую колбу, прибавляют 4 мл серной кислоты раствора 1 М и 60 мл воды и перемешивают. Полученный раствор титруют йодом раствором 0,1 М. Конечную точку титрования определяют потенциометрически с помощью платинового индикаторного электрода.

Расчёт

Каждый мл 0,1 М раствора йода эквивалентен 8,81 мг аскорбиновой кислоты

*Кальций, Магний, Цинк.* Определение проводят методом атомно-абсорбционной спектроскопии.

*Испытуемый раствор.* Точную навеску порошка растертых таблеток, эквивалентную около 40,6 мг кальция, 4,06 мг цинка помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют около 50 мл воды, взбалтывают, затем прибавляют 5,0 мл лантана раствора, 1 мл хлористоводородной кислоты концентрированной, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Полученный раствор фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм. Раствор используют для количественного определения кальция и цинка.

*Испытуемый раствор* (2). Точную навеску порошка растертых таблеток, эквивалентную около 4,06 мг магния помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют около 50 мл воды, взбалтывают, доводят объем водой до метки и перемешивают. 1 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 5 мл лантана раствора, 1 мл хлористоводородной кислоты концентрированной, доводят объем раствора водой до метки, перемешивают и фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм. Используют раствор для количественного определения магния.

*Растворы стандартов* Са, Mg и Zn, 1000 и 10 000 мкг/мл (например, готовые растворы

*Стандартные растворы*. Используя растворы стандартов Са, Mg и Zn, готовят три разведения раствора стандартов известных концентраций, содержащие в каждом мл около:

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Са | Mg | Zn | Растворлантана | Хлористоводородная кислота кон центрированная. |
| Раствор сравнения 1 | 0,0032 мг | 0,00032 мг | 0,00032 мг | 0,05 мл | 0,01 мл |
| Раствор сравнения 2 | 0,0040 мг | 0,00040 мг | 0,00040 мг | 0,05 мл | 0,01 мл |
| Раствор сравнения 3 | 0,0048 мг | 0,00048 мг | 0,00048 мг | 0,05 мл | 0,01 мл |

*Контрольный раствор.* В мерную колбу вместимость 100 мл помещают 5 мл лантана раствора и 1 мл хлористоводородной кислоты концентрированной, доводят объем смеси водой до метки и перемешивают.

Методика

Одновременно проводят определение поглощения стандартного и испытуемого растворов относительно контрольного раствора на подходящем атомно-абсорбционном спектрофотометре:

Лампа, имеющей Ca – Mg - Zn катод

Горелка воздушно - ацетиленовая

при следующих длинах волн:

|  |  |
| --- | --- |
| Элемент | Длина волны линии эмиссии (нм) |
| Са | 422,7 |
| Mg | 285,2 |
| Zn | 213,8 |

По результатам анализа стандартных растворов строят калибровочную кривую зависимости поглощения от концентрации соответствующего элемента в растворе (мг/мл).

Содержание кальция (ХСa) в одной таблетке в процентах заявленного количества вычисляют по формуле:

ХCa=$\frac{C\_{Ca}∙100∙G·100}{a·Lˑ1000}=\frac{CC\_{a}∙10∙G·}{aˑL}$,

где: *ССа* - концентрация кальция в испытуемом растворе, найденная по

калибровочному графику, мг/мл;

а - навеска порошка таблеток, взятая для анализа, мг;

G - средняя масса одной таблетки, мг;

L - заявленное количество кальция в одной таблетке, мг;

1000 – пересчет миллиграмм, г.

Содержание магния (XMg) в процентах в одной таблетке вычисляют по формуле:

ХMg=$\frac{С\_{Mg}∙100∙100∙G·100}{a∙Lˑ1·1000}=\frac{СMg∙1000∙G}{a∙L}$,

где: CMg - концентрация магния в испытуемом растворе, найденная по

калибровочному графику, мг/мл;

а - навеска порошка таблеток, взятая для анализа, мг;

G - средняя масса одной таблетки, мг;

L - заявленное количество магния в одной таблетке, мг.

1000 – пересчет миллиграмм, г.

Содержание цинка (XZn) в процентах в одной таблетке вычисляют по формуле:

XZn=$\frac{C\_{Zn}∙100∙G·100}{a·Lˑ1000}=\frac{CZn∙10∙G}{aˑL}$,

где: CZn - концентрация цинка в испытуемом растворе, найденная по

 калибровочному графику, мг/мл;

а - навеска порошка таблеток, взятая для анализа, мг;

G - средняя масса одной таблетки, мг;

L - заявленное количество цинка в одной таблетке, мг.

1000 – пересчет миллиграмм, г.

# Хранение. При температуре не выше 25 °С. В соответствии с ОФС «Хранение лекарственных средств».