**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |  |
| --- | --- |
| **Аскорбиновая кислота + Никотинамид + Пиридоксина гидрохлорид + Ретинола ацетат + Рибофлавин + альфа-Токоферол ацетат + Тиамина гидрохлорид + Цианокобаламин + Лютеин + Черника + Маточное молочко + Биофлавоноиды цитрусовых + Цинк, Селен, таблетки** ***Acidum ascorbicum + Nicotinamidum + Pyridocxini hydrochloridum + Retinoli acetas + Riboflavinum + Thiamini hydrochloridum + ɑ-Tocopheryli acetas + Cyanocobalaminum +Luteinum + Vaccinium myrtillus + Apilacum + Bioflavonoida citrus + Zincum + Selenium, tabulettae***  |  **ФС**  **Вводится впервые** |

 Настоящая фармакопейная статья распространяется на лекарственный препарат Аскорбиновая кислота + Никотинамид + Пиридоксина гидрохлорид + Ретинола ацетат + Рибофлавин + альфа-Токоферол ацетат + Тиамина гидрохлорид + Цианокобаламин + Цинк, + Селен, таблетки, применяемый в качестве лекарственного средства. В состав таблеток входят также Лютеин, Черника в виде порошка плодов, Маточное молочко, Бифлавоноиды цитрусовых.

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 150 % аскорбиновой кислоты C6H8O6; не менее 90 % и не более 150 % никотинамида С6Н6N2O; не менее 90 % и не более 150 % пиридоксина гидрохлорида C8H11NO3·HCI; не менее 90 % и не более 165 % ретинола ацетата С22Н32О2; не менее 90 % и не более 150 % рибофлавина C17H20N4O6;не менее 90 % и не более 165 % dl-альфа-токоферола ацетата С32Н52О3;не менее 90 % и не более 150 % тиамина гидрохлорида C12H17N4OSˑHCl; не менее 90 % и не более 150 % цианокобаламина C63H88CoN14O14P; не менее 90 % и не более 125 % цинка оксида; не менее 90 % и не более 200 % селена (натрия селенат).

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, а-токоферола ацетата, тиамина гидрохлорид, рибофлавина, пиридоксина гидрохлорида, никотинамида, цианокобаламина, должны соответствовать по времени удерживания соответствующим пикам на хроматограммах стандартных растворов.

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

Наличие абсорбции испытуемого раствора ираствора СО цинка, должно быть одного порядка при длине волны около - 213,8 нм.

*Селен.* УФ - спектр испытуемого раствора должен иметь максимум поглощения при той же длине волны, что и УФ - спектр стандартного раствора. Определение проводят методом спектрофотометрии, описанным в разделе «Количественное определение».

*Аскорбиновая кислота.* Качественная реакция с метиленовым синим.

Взвешивают точно количество порошка растертых таблеток, эквивалентное 0,2 г аскорбиновой кислоты, растворяют в 100 мл спирта концентрации (48,4 % - 49,5 % (об %)). Полученную смесь фильтруют через бумажный фильтр; к 2 мл фильтрата прибавляют 4 капли метиленового синего раствора 0,15 %, нагревают до температуры 40 °С. Раствор приобретает темно - синее окрашивание, которое значительно светлеет или исчезает через 3 мин.

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

Однородность дозирования. Определение проводят в соответствии с ОФС «Однородность дозирования».

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

**Распадаемость.** Не более 30 мин. Определение проводят в соответствии с ОФС «Распадаемость таблеток и капсул» применяя прибор типа «Качающаяся корзинка» и с использованием дисков или иным валидированным методом.

# Условия испытания:

Среда растворения – вода;

Температура - (37 + 2) °С;

объем среды растворения - 900 мл;

Электромеханическое устройство, сообщающее корзинке возвратно-поступательное движение в вертикальной плоскости при частоте 29 - 32 цикла в 1 мин на расстоянии не менее 5,3 см и не более 5,7 см;

время распадаемости - не более 30 мин.

**Количественное определение**

*Ретинола ацетат.* Определение проводят методом ВЭЖХ.

*Испытуемый раствор.* Точную навеску порошка предварительно измельченных таблеток, эквивалентную по содержанию 3,289 мг ретинола ацетата, 63,75 мг альфа-токоферода ацетата помещают в колбу с завинчивающейся крышкой, прибавляют 20 мл диметилсульфоксида и около 25 мл н-гексана, тщательно перемешивают в течение 45 мин на водяной бане при температуре 60 °С. Центрифугируют полученный раствор при 3000 об/мин в течение 10 мин и удаляют слой н-гексана с помощью пипетки в мерную колбу вместимостью 100 мл.

*Раствор А.* К оставшемуся слою диметилсульфоксида прибавляют 20 мл н-гексана, перемешивают в течение 5 мин при комнатной температуре и удаляют слой н-гексана пипеткой в ту же мерную колбу вместимостью 100 мл. Эту операцию повторяют еще два раза, каждый раз прибавляя по 20 мл н-гексана. Объединенные гексановые извлечения, собирают в ту же мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора н-гексаном до метки и перемешивают.

6 мл раствора А переносят в мерную колбу вместимостью 10 мл и доводят объем раствора н-гексаном до метки, перемешивают, фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм (концентрация полученного раствора около 15 мкг ретинола ацетата в мл). Оставшийся раствор А необходимо сохранить для последующего использования при количественном определении витамина Е (альфа токоферола ацетата).

*Стандартный раствор.* Около 15 мг (точная навеска) стандартного образца (СО) trans ретинола ацетата помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл и растворяют в н-гексане, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают. Полученный раствор имеет концентрацию ретинола ацетата около 15 мкг/мл.

*Раствор для проверки пригодности хроматографической системы.*

Около 15 мг (точная навеска) стандартного образца ретинола пальмитата помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, растворяют в н-гексане, доводят объем раствора до метки тем же растворителем и перемешивают. 25 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, добавляют 25 мл стандартного раствора и перемешивают.

Полученный раствор имеет концентрацию 7,5 мкг ретинола ацетата в 1 мл и 7,5 мг ретинола пальмитата в 1 мл.

*Подвижная фаза:* н-гексан.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка: | 150 х 4,6 мм, мономолекулярный слой аминопропилсилана, химически связанный с пористыми частицами силикагеля, 3 мкм  |
| Температура колонки:  | 20 °С  |
| Детектор: | Ультрафиолетовый |
| Длина волны детектирования | УФ, 325 нм |
| Объем пробы: | 40 мкл |
| Скорость потока: | 1,0 мл/мин |

*Условия пригодности хроматографической системы.*

Хроматографируют 40 мкл раствора для проверки пригодности хроматографической системы и записывают хроматограмму.

* фактор разрешения между пиками ретинола ацетата и ретинола пальмитата должен быть не менее 10,
* относительное стандартное отклонение повторных введений должно быть не более 3 %.

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

Х=$\frac{S ∙a\_{0}∙100∙P∙10∙G∙100}{S\_{0}∙1000∙a\_{1}∙L∙6ˑ1000}=\frac{S ∙a\_{0}∙P∙G∙}{S\_{0}∙a\_{1}∙L∙60}$,

где: S - площадь пика ретинола ацетата на хроматограмме испытуемого раствора;

S0 - площадь пика ретинола ацетата на хроматограмме стандартного

раствора;

a0- навеска СО ретинола ацетата для приготовления стандартного

раствора, мг;

a1 - навеска порошка таблеток для приготовления испытуемого

раствора, мг;

G- средняя масса таблеток, мг;

P - содержание ретинола ацетата в CO ретинола ацетат %;

L - заявленное количества ретинола ацетата в одной таблетке, мг;

1000 – пересчет миллиграмм, г.

*Альфа Токоферола ацетат.* Определение проводят методом ВЭЖХ.

*Испытуемый раствор.* 10 мл (точное количество) раствора А, полученного в тесте «Ретинола ацетат», количественно переносят в подходящую по вместимости колбу.

Содержимое колбы упаривают в вакууме досуха при температуре 18 - 20 °С. Сухой осадок при помощи метанола переносят в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят объем раствора метанолом до метки и перемешивают (концентрация dl-альфа - токоферола ацетата около 0,5 мг в мл).

*Стандартный раствор.* Около 30 мг (точная навеска) СО dl-альфа - токоферола ацетата помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в метаноле и доводят объем раствора метанолом до метки и перемешивают. Полученный раствор имеет концентрацию около 0,6 мг/мл альфа - токоферола ацетата.

*Раствор для проверки пригодности хроматографической системы.* Готовят раствор эргокальциферола в метаноле с концентрацией 0,65 мг/мл. Около 65 мг (точная навеска) СО эргокальциферола помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в метаноле и доводят объем раствора метанолом до метки);

1 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, содержащую около 100 мг (точная навеска) СО dl-альфа токоферола ацетата, прибавляют 30 мл метанола, обрабатывают ультразвуком (при необходимости) до растворения СО dl-альфа токоферола ацетата, охлаждают до комнатной температуры, доводят объем раствора метанолом до метки и перемешивают.

*Подвижная фаза*: метанол - раствор А (95 : 5)

*Раствор А*: 10 мл фосфорной кислоты (85 %) переносят в мерную колбу вместимостью 1000 мл, доводят водой объем раствора до метки и перемешивают.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка: | 100 х 8 мм, октадецилсилан, химически связанный с пористым силикагелем иликерамическими микрочастицами, 5 мкм  |
| Температура колонки:  | 20 °С  |
| Детектор: | Ультрафиолетовый |
| Длина волны детектирования | УФ, 254 нм |
| Объем пробы: | 200 мкл |
| Скорость потока: | 2,0 мл/мин |

Вводят в хроматограф 200 мкл раствора для проверки пригодности хроматографической системы и записывают хроматограмму.

* Относительное время удерживания: эргокальциферола около 0,5; альфа токоферила ацетата около 1,0.
* Фактор разрешения между пиками эргокальциферола и альфа

токоферола ацетата должен быть не менее 12, «хвостовой

фактор» — 0,8 - 1,2.

* Относительное стандартное отклонение повторных введений

стандартного раствора должно быть не более 3,0%.

Вводят в хроматограф равные объемы стандартного и испытуемого растворов, записывают хроматограммы.

Содержание альфа -токоферола ацетата, (X) в одной таблетке в процентах от заявленного количества вычисляют по формуле:

Х=$\frac{S ∙a\_{0}∙100∙P∙G∙100}{S\_{0}∙a\_{1}ˑ50∙L∙1000}=\frac{S ∙a\_{0}∙P∙G}{S\_{0}∙a\_{1}∙Lˑ5}$,

где: S - площадь пика dl-альфа токоферола ацетата на хроматограмме

испытуемого раствора;

S0 - площадь пика dl-альфа токоферола ацетата на хроматограмме

стандартного раствора;

a0- навеска СО dl-альфа токоферола ацетата для приготовления

стандартного раствора, мг;

a1 - навеска порошка таблеток для приготовления испытуемого

раствора, мг;

G- средняя масса таблеток, мг;

P - содержание dl-альфа токоферола ацетата в CO dl-альфа токоферола

ацетата, %;

L - заявленное количества dl-альфа токоферола ацетата в одной таблетке, мг;

1000 – пересчет миллиграмм, г.

*Аскорбиновая кислота.* Определение проводят методом титриметрии.

*Раствор метафосфорно-уксусной кислот.* 15 г метафосфорной кислоты растворяют в 40 мл уксусной кислоты ледяной и разводят водой до 500 мл (раствор используют в течение 2 дней после приготовления).

*Стандартный раствор дихлорфенолиндофенола.* В мерную колбу вместимостью 200 мл помещают 50 мг 2,6- дихлорфенолиндофенола натрия, прибавляют 50 мл воды, содержащей 42 мг натрия гидрокарбоната, встряхивают и доводят объем раствора водой до метки, фильтруют. Полученный раствор хранят в посуде янтарного стекла с притертой пробкой, в течение 3 дней после приготовления. Стандартизируют непосредственно перед использованием.

*Стандартизация раствора дихлорфенолиндофенола.* Около 50 мг (точная навеска) аскорбиновой кислоты помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в растворе метафосфорно- уксусной кислот и доводят объем раствора тем же растворителем до метки. 1 мл полученного раствора незамедлительно переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл, содержащую 5 мл раствора метафосфорно-уксусной кислот, быстро титруют раствором дихлорфенолиндофенола до появления розовой окраски, сохраняющейся не менее 5 сек.

Проводят контрольный опыт, титруя раствор, состоящий из 7 мл раствора метафосфорно-уксусной кислот и объема воды, эквивалентного объему раствора дихлорфенолиндофенола, затраченного на титрование раствора аскорбиновой кислоты.

*Испытуемый раствор*. Точную навеску порошка растертых таблеток, эквивалентную 100 мг аскорбиновой кислоты, переносят в мерную колбу вместимостью 200 мл, добавляют 75 мл раствора метафосфорно- уксусной кислот. Встряхивают в течение 30 мин. Раствор доводят водой до метки и перемешивают. Переносят часть раствора в пробирку для центрифугирования и центрифугируют при 1000 об/мин до получения прозрачного надосадочного раствора.

4 мл полученного раствора переносят в коническую колбу емкостью 50 мл, добавляют 5 мл метафосфорно-уксусной кислоты раствора и титруют раствором дихлорфенолиндофенола до появления розовой окраски, сохраняющейся в течение 5 с.

*Параллельно проводят контрольный опыт*, титруя дихлорфенолиндофенолом раствор, состоящий из 5,5 мл раствора метафосфорно-уксусной кислот и 15 мл воды.

Каждый 1 мл раствора дихлорфенолиндофенола, пошедший на титрование, эквивалентен 0,1 мг аскорбиновой кислоты.

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

Х=$\frac{(V\_{1}-V\_{2})∙K∙200ˑG∙100}{4ˑa∙1000}= \frac{(V\_{1}-V\_{2})∙5ˑK∙G}{a},$

где: V1 - объем раствора дихлорфенолиндофенола, израсходованного на

 титрование объема испытуемого раствора, взятого на титрование, мл;

V2- объем раствора дихлорфенолиндофенола, израсходованного в

контрольном опыте, мл;

K - поправочный коэффициент к титру раствора дихлорфенолиндофенола: 0,1 мг / мл;

G- средняя масса таблетки, мг;

a - масса навески порошка таблеток, мг;

1000 – пересчет миллиграмм, г.

*Тиамина гидрохлорид, рибофлавин, пиридоксина гидрохлорид, никотинамид.* Определение проводят методом ВЭЖХ.

*Испытуемый раствор.* Взвешивают и растирают не менее 20 таблеток. Точное количество порошка растертых таблеток, эквивалентное по содержанию 21,656 мг никотинамида 2,166 мг пиридоксина гидрохлорида, 1,841 мг рибофлавина и 1,624 мг тиамина нитрата помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 85 мл растворителя и перемешивают около 30 с до полного суспендирования порошка. Колбу помещают в водяную баню и нагревают в течение 10 мин при температуре 65 - 70 °С, затем помещают на 10 мин в ультразвуковую баню, и повторяют эту операцию еще раз.

Раствор фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм и используют фильтрат в качестве испытуемого раствора. Раствор необходимо использовать в течение 3 ч после приготовления.

*Стандартный раствор.* Около 200 мг (точная навеска) СО никотинамида, около 18 мг (точная навеска) СО пиридоксина гидрохлорида, около 20 мг (точная навеска) СО рибофлавина, около 18 мг (точная навеска) СО тиамина гидрохлорида помещают в мерную колбу вместимостью 200 мл и прибавляют около 180 мл растворителя.

Нагревают на водяной бане при температуре 65 - 70 °С, регулярно помешивая (или попеременно используя водяную и ультразвуковую бани), до полного растворения (около 10 мин). Затем быстро (в течение не более 10 мин) охлаждают на холодной водяной бане до комнатной температуры и доводят объем раствора растворителем до метки, перемешивают.

5 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят до метки растворителем и перемешивают.

Растворитель. Смесь воды, ацетонитрила и ледяной уксусной кислоты в соотношении 94 : 5 : 1 (об/об/об).

Подвижная фаза: 1400 мг натрия гексансульфоната помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, растворяют в смеси: вода, метанол и ледяная уксусная кислота в соотношении 73 : 27 : 1 (об/об/об), доводят объем раствора той же смесью до метки и перемешивают.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка: | 300 х 3,9 мм, октадецилсилан, химически связанный с пористым силикагелем или керамическими микрочастицами, 5 мкм  |
| Температура колонки:  | 20 °С  |
| Детектор: | Ультрафиолетовый |
| Длина волны детектирования | УФ, 280 нм |
| Объем пробы: | 10 мкл |
| Скорость потока: | 1,0 мл/мин |
| Наименование | Относительное время удерживания | Время удерживания (мин) |
| никотинамида | около 0,3 | около 4,5 |
| пиридоксина | около 0,5 | около 6,5 |
| рибофлавина | около 0,8 | около 9 |
| тиамина | около 1,0 | около 19 |

Во время анализа используют посуду из низко-актинического стекла.

Относительное стандартное отклонение повторных введений стандартного раствора не должно превышать 3,0 %.

В хроматографическую систему вводят по 10 мкл стандартного и испытуемого растворов, записывают хроматограммы и рассчитывают содержание пиридоксина гидрохлорида, рибофлавина, тиамина гидрохлорида, никотинамида, (X), в одной таблетке в процентах от заявленного количества по формулам.

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

Х=$\frac{S ∙a\_{0}∙5ˑP∙100ˑG∙100}{S\_{0}∙a\_{1}ˑ200ˑ25∙L∙1000}=\frac{S ∙a\_{0}∙P∙G}{S\_{0}∙a\_{1}∙Lˑ100}$,

где: S - площадь пика никотинамида на хроматограмме испытуемого

 раствора;

S0 - площадь пика никотинамида на хроматограмме стандартного

 раствора;

a0- навеска СО никотинамида для приготовления стандартного раствора,

мг;

a1 - навеска порошка таблеток для приготовления испытуемого раствора, мг;

G- средняя масса таблетки, мг;

P - содержание никотинамида в CO никотинамида, %;

L - заявленное количества никотинамида в одной таблетке, мг;

1000 – пересчет миллиграмм, г.

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

Х=$\frac{S ∙a\_{0}∙5ˑ100ˑP∙G∙100}{S\_{0}∙a\_{1}ˑ200ˑ25∙L∙1000}=\frac{S ∙a\_{0}∙P∙G}{S\_{0}∙a\_{1}∙Lˑ100}$,

где: S - площадь пика пиридоксина гидрохлорида на хроматограмме

 испытуемого раствора;

S0 - площадь пика пиридоксина гидрохлорида на хроматограмме

 стандартного раствора;

a0- навеска СО пиридоксина гидрохлорида для приготовления

стандартного раствора, мг;

a1 - навеска порошка таблеток для приготовления испытуемого раствора, мг;

G- средняя масса таблетки, мг;

P - содержание пиридоксина гидрохлорида в CO пиридоксина

гидрохлорида, %;

L - заявленное количества пиридоксина гидрохлорида в одной таблетке,

мг;

1000 – пересчет миллиграмм, г.

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

Х=$\frac{S ∙a\_{0}∙5ˑ100ˑP∙G∙100}{S\_{0}∙a\_{1}ˑ200ˑ25∙L∙1000}=\frac{S ∙a\_{0}∙P∙G}{S\_{0}∙a\_{1}∙Lˑ100}$,

где: S - площадь пика рибофлавина на хроматограмме испытуемого

раствора;

S0 - площадь пика рибофлавина на хроматограмме стандартного

 раствора;

a0- навеска СО рибофлавина для приготовления стандартного

 раствора, мг;

a1 - навеска порошка таблеток для приготовления испытуемого раствора, мг;

G- средняя масса таблетки, мг;

P - содержание рибофлавина в CO рибофлавина, %;

L - заявленное количества рибофлавина в одной таблетке, мг;

1000 – пересчет миллиграмм, г.

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

Х=$\frac{S ∙a\_{0}∙5ˑ100ˑP∙G∙100}{S\_{0}∙a\_{1}ˑ200ˑ25∙L∙1000}=\frac{S ∙a\_{0}∙P∙G}{S\_{0}∙a\_{1}∙Lˑ100}$,

где: S - площадь пика тиамина гидрохлорида на хроматограмме испытуемого

раствора;

S0 - площадь пика тиамина гидрохлорида на хроматограмме стандартного

 раствора;

a0- навеска СО тиамина гидрохлорида для приготовления стандартного

 раствора, мг;

a1 - навеска порошка таблеток для приготовления испытуемого раствора, мг;

G- средняя масса таблетки, мг;

P - содержание тиамина гидрохлорида в CO тиамина гидрохлорида, %;

L - заявленное количества тиамина гидрохлорида в одной таблетке, мг;

1000 – пересчет миллиграмм, г.

*Цианокобаламин.* В одной таблетке должно содержаться от 90 – 150 % цианокобаламина от заявленного количества. Определение проводят методом ВЭЖХ в соответствии с ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография».

Испытуемый раствор. Точную навеску порошка растертых таблеток, эквивалентную по содержанию 50 мкг цианокобаламина (точная навеска), переносят в колбу вместимостью 250 мл, прибавляют 100 мл воды и экстрагируют в течение 10 мин, отфильтровывают через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм около 10 мл водного извлечения, отбрасывая первые порции фильтрата.

*Стандартный раствор*

Около 10 мг (точная навеска) СО цианокобаламина помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, растворяют в воде, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. 5 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят объем раствора водой до метки и перемешивают (концентрация раствора цианокобаламина около 0,5 мкг/мл).

*Подвижная фаза:* метанол – вода 35 : 65.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка: | 150 х 4,6 мм, октадецилсилан, химически связанный с пористым силикагелем или керамическими микрочастицами, 5 мкм  |
| Температура колонки:  | 20 °С |
| Детектор: | 550 нм |
| Объем пробы: | 200 мкл |
| Скорость потока: | 0,5 мл/мин |

Пригодность хроматографической системы:

Относительное стандартное отклонение пяти повторных введений стандартного раствора не должно превышать 3,0 %.

Критерий разделения двух пиков не менее 1;

Критерий ассиметрии пиков не более 3.

Вводят равные объемы стандартного и испытуемого растворов в хроматограф и записывают хроматограммы.

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

Х=$\frac{S ∙a\_{0}ˑ5ˑ100ˑP∙G∙100}{S\_{0}∙a\_{1}ˑ100∙L∙1000}=\frac{S ∙a\_{0}∙P∙G}{S\_{0}∙a\_{1}∙Lˑ2}$,

где: S - площадь пика цианокобаламина на хроматограмме испытуемого

 раствора;

S0 - площадь пика цианокобаламина на хроматограмме стандартного

 раствора;

a0- навеска СО цианокобаламина для приготовления стандартного

раствора, мг;

a1 - навеска порошка таблеток для приготовления испытуемого раствора, мг;

G- средняя масса таблетки, мг;

P - содержание цианокобаламина в CO цианокобаламина, %;

L - заявленное количества цианокобаламина в одной таблетке, мг;

1000 – пересчет миллиграмм, г.

*Цинк.* В одной таблетке должно содержаться от 90 до – 125 % цинка от заявленного количества. Определение проводят методом атомно-абсорбционной спектрометрии (ААС) в соответствии с ОФС «Атомно-абсорбционная спектрометрия».

*Испытуемый раствор.* Точную навеску порошка растертых таблеток, эквивалентную массе 75 мг цинка оксида, переносят в фарфоровый тигель, прокаливают в муфельной печи при температуре около 550 °С от 6 до 12 ч и охлаждают до комнатной температуры. К содержимому с соблюдением мер предосторожности добавляют 60 мл хлористоводородной кислоты концентрированной 36,5 - 38 % и кипятят в течение 30 мин, периодически омывая внутреннюю поверхность тигля хлористоводородной кислотой раствором 6 М. Содержимое тигля охлаждают и переносят количественно в мерную колбу вместимостью 100 мл. Стенки тигля промывают небольшими порциями хлористоводородной кислоты раствора 6 М и добавляют в ту же колбу. Доводят объем раствора водой до метки, перемешивают и фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм, отбрасывая первые 5 мл фильтрата.

5 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 250 мл, доводят объем раствора хлористоводородной кислотой раствором 0,125 М до метки и перемешивают.

4 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора хлористоводородной кислотой раствором 0,125 М до метки и перемешивают (концентрация раствора около 1 мкг цинка в мл).

 Хлористоводородной кислоты раствор 0,125 М. 10,6 мл хлористоводородной кислоты концентрированной (плотность около 1,19) переносят в мерную колбу вместимостью 1000 мл, объем раствора доводят водой очищенной до метки и перемешивают.

*Базовый стандартный раствор.* Около 311 мг (точная навеска) цинка оксида помещают в мерную колбу вместимостью 250 мл, прибавляют 80 мл хлористоводородной кислоты раствора 6 М и, в случае необходимости, нагревают до растворения. Затем раствор охлаждают и доводят водой до метки. Полученный раствор содержит около 1000 мкг цинка в 1 мл.

*Стандартный раствор.* 10 мл базового стандартного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 200 мл и доводят объем раствора хлористоводородной кислотой раствором 0,125 М до метки (концентрация цинка около 50 мкг/мл).

Калибровочные растворы. В мерные колбы вместимостью 100 мл вносят 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 и 5,0 мл стандартного раствора цинка, доводят объем раствора хлористоводородной кислотой раствором 0,125 М до метки и перемешивают.

В результате получают серию калибровочных растворов со следующими концентрациями: 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 и 2,5 мкг цинка в 1 мл.

*Построение калибровочного графика.* Последовательно определяют поглощение калибровочных и испытуемого растворов при длине волны около 213,8 нм на атомно-абсорбционном спектрометре. В качестве раствора сравнения используют хлористоводородной кислоты раствор 0,125 М. Калибровочный график строят при каждом определении, откладывая на оси абсцисс концентрацию цинка, а по оси ординат интенсивность испускания от содержания цинка.

Среднее содержание цинка (X), в одной таблетке в процентах вычисляют по формуле:

Х=$\frac{0,001∙C∙100ˑ250∙50ˑG∙100}{5∙4∙a\_{1}∙L∙1000}=\frac{25∙C∙G}{4ˑa\_{1}∙L}$,

где: С - концентрация цинка в испытуемом растворе, определенная с

помощью калибровочного графика, мкг/мл;

a1 - навеска порошка таблеток для приготовления испытуемого

раствора, мг;

G - средняя масса таблетки, мг;

L – заявленное количество цинка в одной таблетке, мг;

1000 - пересчет миллиграмм, г.

*Селен.* Определение проводят методом спектрофотометрии в соответствии с ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях».

*Испытуемый раствор.* Взвешивают и растирают в ступке не менее 20 таблеток. Точную навеску порошка, эквивалентную по содержанию 20 мкг селена, помещают в градуированную лабораторную колбу вместимостью 50 мл. Добавляют 10 мл азотной кислоты концентрированной и осторожно нагревают при температуре 30 – 40 °С до исчезновения признаков первоначальной реакции, вызванной добавлением азотной кислоты концентрированной, добавляют 3 мл хлорной кислоты. Продолжают нагревание раствора до появления испарений хлорной кислоты (белого цвета) или до начала потемнения содержимого колбы. Добавляют 0,5 мл азотной кислоты концентрированной. Если произошло потемнение содержимого колбы, добавляют дополнительное количество азотной кислоты концентрированной. Продолжают нагревание в течение 10 мин (начинают отсчет с момента появления паров хлорной кислоты) или до обесцвечивания содержимого колбы. Охлаждают до комнатной температуры, добавляют 2,5 мл кислоты хлористоводородной раствора. Нагревают при температуре 60 -70 °С в течение 3 мин для удаления остатков азотной кислоты, затем раствор доводят до кипения и охлаждают до комнатной температуры. Доводят объем раствора водой до 20 мл.

Добавляют 5 мл раствора А, осторожно перемешивают и доводят аммиака раствором 50 % до pH 1,1 + 0,1 (потенциометрически). Затем добавляют 5 мл раствора Б, осторожно перемешивают. Нагревают на водяной бане при температуре 50 °С в течение 30 мин в защищенном от прямых солнечных лучей месте и охлаждают до комнатной температуры.

Содержимое колбы помещают в разделительную воронку. Добавляют 10 мл циклогексана, энергично встряхивают в течение 1 мин. Дают слоям отстоятся и удаляют водный слой. Слой циклогексана переносят в пробирку для центрифугирования и центрифугируют при 1000 об/мин в течение 1 мин для отделения остатков воды.

*Раствор сравнения.* В градуированную лабораторную колбу вместимостью 50 мл с притертой пробкой переносят 1 мл хлорной кислоты и 1 мл хлористоводородной кислоты раствора, доводят объем раствора водой до 20 мл и перемешивают. Добавляют 5 мл раствора А, осторожно перемешивают, доводят аммиака раствором 50 % до pH 1,1 + 0,1 (потенциометрически).

Добавляют 5 мл раствора Б и осторожно перемешивают. Нагревают на водяной бане при температуре (50 °С) в течение 30 мин в защищенном от прямых солнечных лучей месте и охлаждают до комнатной температуры.

Содержимое колбы помещают в разделительную воронку. Добавляют 10 мл циклогексана, энергично встряхивают в течение 1 мин. Дают слоям отстоятся и удаляют водный слой. Слой циклогексана переносят в пробирку для центрифугирования и центрифугируют при 1000 об/мин в течение 1 мин для отделения остатков воды.

*Хлористоводородной кислоты раствор.* 50 мл хлористоводородной кислоты концентрированной (35 – 38 %) переносят в мерную колбу вместимостью 500 мл, доводят объем раствора водой очищенной до метки.

*Аммиака раствор 50 %.* 250 мл аммиака раствора концентрированного (25 – 28 %) переносят в мерную колбу вместимостью 500 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

*Раствор А.* 4,5 г натрия эдетата переносят в мерную колбу вместимостью 500 мл, растворяют в 400 мл воды, добавляют 12,5 г гидроксиламина гидрохлорида, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

*Раствор Б.* 200 мг 2,3-диаминонафталина помещают в разделительную воронку вместимостью 250 мл, добавляют 200 мл хлористоводородной кислоты раствора 0,1 М. Промывают раствор тремя порциями н-циклогексана по 40 мл каждая и отбрасывают слой циклогексана Полученный раствор фильтруют. Раствор хранят во флаконе темного стекла, под 1 см слоем н-циклогексана, при температуре от 2 до 8°С, не более 1 недели.

*Базовый стандартный раствор.* Около 1 г (точная навеска) металлического селена помещают в подходящую по вместимости колбу и растворяют в минимально возможном объеме азотной кислоты концентрированной. Выпаривают раствор досуха, прибавляют 2 мл воды, перемешивают и снова упаривают раствор досуха. Процедуру, добавления воды и выпаривания, повторяют 3 раза. Сухой остаток растворяют в хлористоводородной кислоты растворе 3 М, переносят раствор в мерную колбу вместимостью 1000 мл и доводят объем раствора тем же растворителем до метки. Полученный раствор содержит около 1000 мкг селена в 1 мл.

10 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 250 мл, доводят объем раствора хлористоводородной кислоты раствором 0,125 М до метки, перемешивают.

5,0 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора хлористоводородной кислотой раствором 0,125 М до метки, перемешивают (концентрация раствора около 2 мкг селена в мл).

*Стандартный раствор.* 10 мл базового стандартного раствора переносят в градуированную лабораторную колбу вместимостью 50 мл с притертой пробкой. Добавляют 1,0 мл хлорной кислоты, 1 мл хлористоводородной кислоты раствора, доводят объем раствора водой до 20 мл.

Добавляют 5 мл раствора А, осторожно перемешивают, доводят аммиака раствором 50 % до pH 1,1 ± 0,1 (потенциометрически). Добавляют 5 мл раствора Б, осторожно перемешивают. Нагревают на водяной бане при температуре 50 °С в течение 30 мин, в защищенном от прямых солнечных лучей месте. Охлаждают до комнатной температуры, содержимое колбы помещают в разделительную воронку.

Добавляют 10 мл циклогексана, энергично встряхивают в течение 1 мин. Дают слоям отстоятся и удаляют водный слой. Переносят слой циклогексана в пробирку для центрифугирования, центрифугируют при 1000 об/мин течение 1 мин, для отделения остатков воды.

Определяют поглощение испытуемого и стандартного растворов относительно раствора сравнения, в кювете 10 мм, в максимуме поглощения на длине волны 380 нм.

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

$$X=\frac{A\_{1}∙a\_{0}∙10∙5∙P∙G∙10∙100}{A\_{0}∙a\_{1}∙250∙100∙L∙1000}=\frac{A\_{1}∙a\_{0}∙P∙G}{A\_{0}∙a\_{1}∙L∙500},$$

где: A1 - поглощение испытуемого раствора;

A0 - поглощение стандартного раствора;

a0 - навеска селена для приготовления стандартного раствора, мг;

a - навеска порошка таблеток для приготовления испытуемого

раствора,

G- средняя масса таблетки, мг.

P – содержание селена в стандартном образце селена, %;

L - заявленное количество селена в одной таблетке, мг

**Хранение.** В сухом месте при температуре 10 – 30 °С. В соответствии с ОФС «Хранение лекарственных средств».