МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Аскорбиновая кислота + Кальция пантотенат + Колекальциферол + Лютеин + Никотинамид + Пиридоксина гидрохлорид + Ретинола ацетат + Рибофлавин + Рутозид + Альфа-токоферола ацетат + Тиамина гидрохлорид + Тиоктовая кислота + Фолиевая кислота + Цианокобаламин + Железо+Кальций+Йод+Магний+ Марганец + Медь + Селен + Цинк, таблетки  *Acidum ascorbicum + Calcii pantotenas + Colecalciferolum +Luteinum + Nicotinamidum + Pyridoxini hydrochloridum + Retinoli acetas + Riboflavinum + Rutosidum + Thiamini hydrochloridum + Acidum thiocticum + ɑ-Tocopheroli acetas + Acidum folicum + Cyanocobalaminum + Ferrum + Calcium + Iodum + Magnesium + Manganium + Cuprum + Selenium + Zincum, tabulettae* |  | ФС  Вводится впервые |

Настоящая фармакопейная статья распространяется на лекарственный препарат Аскорбиновая кислота + Кальция пантотенат + Колекальциферол + Лютеин + Никотинамид + Пиридоксина гидрохлорид + Ретинола ацетат + Рибофлавин + Рутозид + Альфа-токоферола ацетат + Тиамина гидрохлорид + Тиоктовая кислота + Фолиевая кислота + Цианокобаламин + Железо + Кальций + Йод + Магний + Марганец + Медь + Селен + Цинк, таблетки (таблетки, покрытые оболочкой). Препарат должен соответствовать требованиям ОФС «Таблетки» и нижеприведенным требованиям.

Содержит: от заявленного количества

* аскорбиновой кислоты C6H8O –не менее 80,0 % и не более 120,0 %;
* кальция пантотената C18H32CaN2O10 –не менее 70,0 % и не более 150,0 %;
* колекальциферола C27H44O – не менее 60,0 % и не более 160,0 %;
* лютеина C₄₀H₅₆O₂ – не менее 70,0 % и не более 160,0 %;
* никотинамида С6Н6N2O – не менее 80,0 % и не более 140,0 %;
* пиридоксина гидрохлорида C8H11NO3·HCI – не менее 70,0 % и не более 150,0 %;
* ретинола ацетата С36Н60О2 –не менее 70,0 % и не более 150,0 %;
* **р**ибофлавина C17H20N4O6 –не менее 70,0 % и не более 150,0 %;
* рутозида C27H30O16 –не менее 80,0 % и не более 120,0;
* α-токоферола ацетата С32Н52О3 –не менее 70,0 % и не более 150,0 %**;**
* тиамина гидрохлорида C12H17N4OS·HCl – не менее 70,0 % и не более 150,0 %;
* тиоктовой кислоты C8H14O2S2 не менее 60,0 % и не более 160,0 %
* фолиевой кислоты C₁₉H₁₉N₇O₆ не менее 70,0 % и не более 160,0 %;
* цианокобаламина C63H88CoN14O14P – не менее 60,0 % и не более 160,0 %;
* железа в виде железа фумарата не менее 80,0 % и не более 120,0 %;
* кальция в виде кальция карбоната не менее 80 % и не более120 %;
* магния в виде магния лактата дигидрата не менее 80 % и не более 160 %
* йода в виде натрия йодида не менее 70 % и не более 160 %;
* марганца в виде марганца (II) сульфата моногидрата не менее 70 % и не более 130 %;
* меди в виде меди (II) сульфата пентагидрата; не менее 70 % и не более 130 %;
* селена в виде натрия селенита; не менее 80 % и не более 120 %;
* цинка в виде цинка сульфата гептагидрата не менее 80,0 % и не более 120,0 %.

Описание. Содержание раздела приводится в соответствии с ОФС «Таблетки».

**Подлинность**

*ВЭЖХ*. Время удерживания основных пиков на хроматограммах испытуемых растворов должно соответствовать времени удерживания соответствующих пиков *ретинола ацетата, α-токоферола ацетата,**колекальциферола, тиамина гидрохлорида, рибофлавина, пиридоксина гидрохлорида, никотинамида, фолиевой кислоты, аскорбиновой кислоты, рутозида, пантотеновой кислоты, цианокобаламина и тиоктовой кислоты* на хроматограммах соответствующих растворов стандартного образца или стандартных растворов (раздел «Количественное определение»).

Спектрофотометрия. Спектр поглощения испытуемого раствора, приготовленного для испытания «Количественное определение. *Лютеин*», в области длин волн от 440 до 490 нм должен иметь максимумы при 452 нм и 475 нм.

А*томно-абсорбционная спектрометрия*. Спектры поглощения испытуемого и соответствующего стандартного раствора *кальция, железа, магния, меди, цинка или марганца* должны иметь максимумы при одних и тех же длинах волн (раздел «Количественное определение»).

Качественная реакция. Испытуемый раствор, полученный в испытании «Количественное определение. Селен», при длинах волн 366 и 520 нм должен давать флуоресценцию.

*Качественная реакция.* К 5 мл испытуемого раствора, приготовленного в разделе «Количественное определение. *Аскорбиновая кислота*», прибавляют 5 мл фосфорномолибденовой кислоты раствора.

Качественная реакция. Определение проводят в испытании «Количественное определение. *Йод*». При прибавлении к испытуемому раствору натрия нитрата раствора 25 % в присутствии серной кислоты концентрированной (индикатор – метилового оранжевого спиртовой раствор 0,1 %) хлороформный слой должен окрашиваться в розово-фиолетовый цвет.

*Микробиологический метод*. Определение проводят в соответствии ОФС «Определение содержания витаминов в многокомпонентных лекарственных препаратах микробиологическим методом. Кальция пантотенат, Цианокоболамин», метод 1.

Распадаемость. Не более 60 мин (с использованием дисков в соответствии, ОФС «Распадаемость таблеток и капсул»).

**Однородность массы.** В соответствии с ОФС «Однородность массы дозированных лекарственных форм».

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

Количественное определение

*Ретинола ацетат, α-токоферола ацетат*. Определение проводят методом ВЭЖХ (ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография»).

Фосфорной кислоты раствор. В мерную колбу вместимостью 500 мл помещают 5 мл фосфорной кислоты раствора 0,05 М и доводят объем раствора водой до метки.

Подвижная фаза А (ПФА). Метанол—фосфорной кислоты раствор—ацетонитрил 50:250:700.

Подвижная фаза Б (ПФБ). Метанол⎯ацетонитрил 50:950.

Испытуемый раствор. Точную навеску порошка растертых таблеток, соответствующую около 0,5 мг ретинола ацетата ине менее 15,0 мг и не более 21,5мг α-токоферола ацетата помещают в коническую колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 10 мл хлористоводородной кислоты раствора 0,1 М, 2 мл спирта 96 % и нагревают на водяной бане при температуре 60-65 °С при перемешивании в течение 3 мин. Полученный раствор охлаждают до комнатной температуры и количественно переносят с использованием 10 мл спирта 96 % в делительную воронку вместимостью 100 мл, экстрагируют 20 мл гексана в течение 3 мин. Экстракцию повторяют дважды по 15 мл гексана. Гексановые экстракты объединяют и фильтруют через фильтр с 3 г натрия сульфата безводного в круглодонную колбу вместимостью 100 мл. Фильтр промывают 10 мл гексана, все фильтраты объединяют. Гексан отгоняют под вакуумом на роторном испарителе при температуре не более 40 °С. Полученный сухой остаток растворяют в необходимом количестве метанола и количественно переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора метанолом до метки и фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм.

Стандартный раствор. Готовят раствор стандартных образцов ретинола ацетата и α-токоферола ацетата в метаноле в концентрациях, соответствующих ожидаемому содержанию ретинола ацетата и α-токоферола ацетата в испытуемом растворе.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 125 х 4,0 мм силикагель октадецилсилильный для хроматографии, 5 мкм; |
| Температура колонки | 25 °С; |
| Детектор | спектрофотометрический:  326 нм – для ретинола ацетата,  284 нм – для ɑ-токоферола ацетата; |
| Объем пробы | 20 мкл; |
| Скорость потока | 1,0 мл/мин. |

*Режим хроматографирования*

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Время, мин | ПФА, % | ПФБ, % |
| 0-10 | 70 | 30 |
| 10-14 | 70→0 | 30→100 |
| 14-28 | 0 | 100 |
| 28-29 | 0→70 | 100→30 |
| 29-34 | 70 | 30 |

Хроматографируют стандартный и испытуемый растворы.

*Время удерживания соединений*. Ретинола ацетат – около 9 мин, α-токоферола ацетат – около 22 мин.

*Пригодность хроматографической системы*. Хроматографическая система считается пригодной, если на хроматограмме стандартного раствора:

– *разрешение (RS)* между пиками ретинола ацетата и α-токоферола ацетата должно быть не менее 5,0;

– *фактор асимметрии* *пика (AS)* ретинола ацетата должен быть не более 2,0.

– *фактор асимметрии* *пика (AS)* α-токоферола ацетата должен быть не более 2,0.

– *относительное стандартное отклонение* площади пика ретинола ацетата должно быть не более 2,0 % (6 определений);

– *относительное стандартное отклонение* площади пика α-токоферола ацетата должно быть не более 2,0 % (6 определений);

– *эффективность хроматографической колонки (N)*, рассчитанная по пику α-токоферола ацетата, должна составлять не менее 1500 теоретических тарелок.

Содержание ретинола ацетата С36Н60О2 (α-токоферола ацетата С32Н52О3) в процентах от заявленного количества (X) вычисляют по формуле:

Х=,

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *S*1 | **–** | площадь пика ретинола ацетата (α-токоферола ацетата) на хроматограмме испытуемого раствора; |
|  | *S*0 | **–** | площадь пика ретинола ацетата (α-токоферола ацетата) на хроматограмме стандартного раствора; |
|  | *a*1 | **–** | навеска порошка растертых таблеток, мг; |
|  | *a*0 | **–** | навеска стандартного образца ретинола ацетата (α-токоферола ацетата), мг; |
|  | *F* | **–** | фактор разведения стандартного раствора; |
|  | *P* | **–** | содержание ретинола ацетата (α-токоферола ацетата) в стандартном образце ретинола ацетата (α-токоферола ацетата), %; |
|  | *L* | **–** | заявленное количество ретинола ацетата (α-токоферола ацетата) в одной таблетке, мг; |
|  | *G* | **–** | средняя масса одной таблетки, мг. |

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

Все растворы защищают от действия света, используют посуду из темного стекла.

Подвижная фаза А (ПФА). В мерную колбу вместимостью 1 л помещают 75 мл изопропилового спирта, доводят объем раствора гексаном до метки.

Срок годности раствора – не более 8 ч.

Подвижная фаза Б (ПФБ). Гексан.

Испытуемый раствор. Точную навеску порошка растертых таблеток, соответствующую не менее 5,0 мкг и не более 12,5 мкг колекальциферола, помещают в пробирку вместимостью 15 мл, прибавляют 5 мл аммиака раствора 10 %, 5 мл спирта 96 %, встряхивают до полного смачивания порошка, нагревают на водяной бане при температуре 55±2 °С в течение 3 мин, быстро охлаждают до комнатной температуры, прибавляют 2 мл гексана, интенсивно встряхивают в течение 3 мин и центрифугируют при 2000 об/мин в течение 5 мин. В пробирку Эппендорфа помещают 1,0 мл верхнего (гексанового) слоя, прибавляют около 0,3 г натрия сульфата безводного, закрывают пробкой, встряхивают в течение 10-15 с и фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм.

Срок годности раствора – не более 8 ч.

Раствор стандартного образца колекалъциферола. Готовят раствор стандартного образца колекальциферола в гексане в концентрации, соответствующей ожидаемому содержанию колекальциферола в испытуемом растворе.

Срок годности раствора – не более 8 ч.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 250 х 4,6 мм, силикагель октадецилсилильный для хроматографии, 5 мкм; |
| Температура колонки | 25 °С; |
| Детектор | спектрофотометрический, 265 нм; |
| Объем пробы | 50 мкл; |
| Скорость потока | 1,0 мл/мин. |

*Режим хроматографирования*

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Время, мин | ПФА, % | ПФБ, % |
| 0-11 | 20 | 80 |
| 11-12 | 20→100 | 80→0 |
| 12-22 | 100 | 0 |
| 22-23 | 100→20 | 0→80 |
| 23-30 | 20 | 80 |

Хроматографируют раствор стандартного образца колекальциферола и испытуемый раствор.

*Пригодность хроматографической системы*. Хроматографическая система считается пригодной, если на хроматограмме раствора стандартного образца колекальциферола:

– *фактор асимметрии* *пика (AS)* колекальциферола должен быть не более 1,5.

– *относительное стандартное отклонение* площади пика колекальциферола должно быть не более 2,0 % (6 определений);

– *эффективность хроматографической колонки (N)*, рассчитанная по пику колекальциферола, должна составлять не менее 2000 теоретических тарелок.

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

Х=,

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | S1 | – | площадь пика колекальциферола на хроматограмме испытуемого раствора; |
|  | S0 | – | площадь пика колекальциферола на хроматограмме раствора стандартного образца колекальциферола; |
|  | a1 | – | навеска порошка растёртых таблеток, мг; |
|  | a0 | – | навеска стандартного образца колекальциферола, мг; |
|  | F | – | фактор разведения раствора стандартного образца колекальциферола; |
|  | P | – | содержание колекальциферола в стандартном образце колекальциферола, %. |
|  | L | – | заявленное количество колекальциферола в одной таблетке, мг; |
|  | G | – | средняя масса одной таблетки, мг. |

*Тиамина гидрохлорид, рибофлавин, пиридоксина гидрохлорид, никотинамид, фолиевая кислота.* Определение проводят методом ВЭЖХ (ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография»).

Раствор А. В мерную колбу вместимостью 1 л помещают 1,06 г натрия гексилсульфоната, растворяют в 800 мл воды, прибавляют 10 мл уксусной кислоты ледяной, 0,5 мл триэтиламина, перемешивают и доводят объем раствора водой до метки.

Раствор Б. Раствор А—ацетонитрил 300:200.

Подвижная фаза ПФ. Раствор А—раствор Б 750:250.

Аммиака раствор. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 34,1 мл аммиака водного и доводят объем раствора водой до метки.

Растворитель. В мерную колбу вместимостью 1 л помещают 12,8 г аммония ацетата, растворяют в 500 мл воды, прибавляют 50 мл ацетонитрила, 10 мл уксусной кислоты ледяной и доводят объем раствора водой до метки.

Испытуемый раствор. Точную навеску порошка растертых таблеток, соответствующую не менее 0,8 мг и не более 1,3 мг тиамина гидрохлорида, не менее 1,0 мг и не более 1,8 мг рибофлавина, не менее 2,5 мг и не более 5,0 мг пиридоксина гидрохлорида, не менее 9,0 мг и не более 13,8 мг никотинамида, не менее 0,22 мг и не более 0,4 мг фолиевой кислоты, помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 80 мл растворителя, встряхивают в течение 5 мин до полного смачивания порошка, выдерживают на водяной бане при температуре 80-85 °С в течение 10 мин, встряхивая каждые 2 мин. Полученный раствор обрабатывают ультразвуком в течение 15 мин, быстро охлаждают до комнатной температуры и доводят объем раствора растворителем до метки. В центрифужную пробирку вместимостью 15 мл помещают 15,0 мл полученного раствора и центрифугируют при 8000 об/мин в течение 10 мин. Отделяют надосадочную жидкость и фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм.

Стандартный раствор. Готовят раствор стандартных образцов тиамина гидрохлорида, рибофлавина, пиридоксина гидрохлорида, никотинамида в растворителе в концентрации, соответствующей ожидаемому содержанию тиамина гидрохлорида, рибофлавина, пиридоксина гидрохлорида, никотинамида в испытуемом растворе.

Раствор стандартного образца *фолиевой кислоты*. Около 80 мг (точная навеска) стандартного образца фолиевой кислоты помещают мерную колбу вместимостью 200 мл, растворяют в смеси 50 мл воды и 2 мл аммиака раствора и доводят объем раствора водой до метки. При необходимости полученный раствор дополнительно разводят растворителем до концентрации, соответствующей ожидаемому содержанию фолиевой кислоты в испытуемом растворе.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 150 х 4,6 мм, силикагель октадецилсилильный для хроматографии, 5 мкм; |
| Температура колонки | 25 °С; |
| Детектор | спектрофотометрический:  260 нм – для тиамина рибофлавина и никотинамида,  280 нм – для пиридоксина и фолиевой кислоты; |
| Объем пробы | 10 мкл; |
| Скорость потока | 1,0 мл/мин. |

Хроматографируют раствор стандартного образца фолиевой кислоты, стандартный и испытуемый растворы.

При хроматографировании испытуемого раствора, после выхода пика рибофлавина, колонку промывают в течение 10 мин раствором Б для удаления из колонки рутозида и уравновешивают колонку ПФ.

*Время удерживания соединений*. Никотинамид – около 3,5 мин; пиридоксин – около 5,0 мин; фолиевая кислота – около 8,0 мин; тиамин – около 10,5 мин; рибофлавин – около 16,0 мин.

*Пригодность хроматографической системы*. Хроматографическая система считается пригодной, если на хроматограмме стандартного раствора:

– *разрешение (RS)* между соседними пиками должно быть не менее 2,0.

– *фактор асимметрии* *пика (AS)* каждого из определяемых веществ должен быть не более 1,5.

– *относительное стандартное отклонение* площади каждого из пиков должно быть не более 5,0 % (6 определений);

– *эффективность хроматографической колонки (N)*, рассчитанная по пику никотинамида, должна составлять не менее 2000 теоретических тарелок.

Содержание тиамина гидрохлорида C12H17N4OS·HCl (рибофлавина C17H20N4O6 или пиридоксина гидрохлорида C8H11NO3·HCI, или никотинамида С6Н6N2O) в препарате в процентах от заявленного количества (X) вычисляют по формуле:

Х=,

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | S1 | – | площадь каждого из пиков тиамина гидрохлорида, рибофлавина, пиридоксина гидрохлорида, никотинамида на хроматограмме испытуемого раствора; |
|  | S0 | – | площадь каждого соответствующего пика на хроматограмме раствора сравнения; |
|  | a0 | – | навеска соответствующего стандартного образца, мг; |
|  | a1 | – | навеска порошка растёртых таблеток, мг; |
|  | F | – | фактор разведения стандартного раствора; |
|  | P | – | содержание колекальциферола в стандартном образце колекальциферола, %. |
|  | G | – | средняя масса одной таблетки, мг. |
|  | L | – | заявленное количество колекальциферола в одной таблетке, мг. |

Содержание фолиевой кислоты C₁₉H₁₉N₇O₆ в препарате в процентах от заявленного количества (X) вычисляют по формуле:

Х=,

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | S1 | – | площадь пика фолиевой кислоты на хроматограмме испытуемого раствора; |
|  | S0 | – | площадь пика фолиевой кислоты на хроматограмме раствора стандартного образца фолиевой кислоты; |
|  | a0 | – | навеска стандартного образца фолиевой кислоты, мг; |
|  | a1 | – | навеска порошка растёртых таблеток, мг; |
|  | F | – | фактор разведения раствора стандартного образца фолиевой кислоты; |
|  | P | – | содержание фолиевой кислоты в стандартном образце фолиевой кислоты, %. |
|  | G | – | средняя масса одной таблетки, мг. |
|  | L | – | заявленное количество фолиевой кислоты в одной таблетке, мг. |

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

*Подвижная фаза (ПФ).* Растворяют 6,8 г калия дигидрофосфата в 900 мл воды, доводят рН раствора фосфорной кислотой концентрированной до 2,7±0,1. Полученный раствор переносят в мерную колбу вместимостью 1 л и доводят объём раствора водой до метки.

*Растворитель.* В мерную колбу вместимостью 1 л помещают около 6,8 г калия дигидрофосфата, около 0,2 г натрия эдетата дигидрата, растворяют в 900 мл воды при нагревании до 60 °С до полного растворения. После охлаждения до комнатной температуры прибавляют 1 г натрия метабисульфита, растворяют и доводят объём полученного раствора водой до метки.

*Испытуемый раствор.* Точную навеску порошка растертых таблеток, соответствующую около 50 мг аскорбиновой кислоты, помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 30 мл метанола, обрабатывают ультразвуком в течение 10 мин, охлаждают до комнатной температуры и доводят объем раствора растворителем до метки. Полученный раствор центрифугируют при 9000 об/мин в течение 10 мин. В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 4,0 мл полученной надосадочной жидкости и доводят объём раствора растворителем до метки и фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм.

*Раствор* стандартного образца *аскорбиновой кислоты*. Около 50 мг (точная навеска) стандартного образца аскорбиновой кислоты помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл помещают, прибавляют 20 мл метанола, обрабатывают ультразвуком в течение 10 мин, охлаждают до комнатной температуры и доводят объём раствора тем же растворителем до метки. В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 2,0 мл полученного раствора, доводят объём раствора растворителем до метки и фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 125 × 4,0 мм, **силикагель октадецилсилильный для хроматографии**, 5 мкм; |
| Температура колонки | 25 °С; |
| Скорость потока | 0,7 мл/мин; |
| Детектор | спектрофотометрический, 243 нм; |
| Объём пробы | 20 мкл. |

Хроматографируют раствор стандартного образца аскорбиновой кислоты и испытуемый раствор.

*Пригодность хроматографической системы*. Хроматографическая система считается пригодной, если на хроматограмме раствора стандартного образца аскорбиновой кислоты:

– *фактор асимметрии* *пика (AS)* аскорбиновой кислоты должен быть не более 1,8.

– *относительное стандартное отклонение* площади пика аскорбиновой кислоты должно быть не более 1,5 % (6 определений);

– *эффективность хроматографической колонки (N)*, рассчитанная по пику аскорбиновой кислоты, должна составлять не менее 2000 теоретических тарелок.

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

Х=,

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | S1 | – | площадь пика аскорбиновой кислоты на хроматограмме испытуемого раствора; |
|  | S0 | – | площадь пика аскорбиновой кислоты на хроматограмме раствора стандартного образца аскорбиновой кислоты; |
|  | a1 | – | навеска порошка растёртых таблеток, мг; |
|  | a0 | – | навеска стандартного образца аскорбиновой кислоты, мг; |
|  | P | – | содержание аскорбиновой кислоты в стандартном образце аскорбиновой кислоты, %. |
|  | G | – | средняя масса одной таблетки, мг. |
|  | L | – | заявленное количество аскорбиновой кислоты в одной таблетке, мг. |

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

Подвижная фаза (ПФ). В мерной колбе вместимостью 1 л смешивают 600 мл воды, 350 мл метанола, 10 мл уксусной кислоты ледяной и доводят объем раствора водой до метки.

Растворитель. Вода—метанол 300:700.

Испытуемый раствор. Точную навеску порошка растертых таблеток, соответствующую не менее 23,7 мг и не более 30 мг рутозида, помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 30 мл метанола, обрабатывают ультразвуком в течение 10 мин, быстро охлаждают до комнатной температуры и доводят объем полученного раствора метанолом до метки. Полученный раствор переносят в центрифужную пробирку, центрифугируют при 9000 об/мин в течение 10 мин. В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 5,0 мл надосадочной жидкости, доводят объем раствора растворителем до метки и фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм.

Раствор стандартного образца рутозида тригидрата. Около 30 мг (точная навеска) стандартного образца рутозида тригидрата помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 20 мл метанола, обрабатывают ультразвуком в течение 10 мин, охлаждают до комнатной температуры и доводят объем раствора тем же растворителем до метки. При необходимости полученный раствор дополнительно разводят растворителем до концентрации, соответствующей ожидаемому содержанию рутозида в испытуемом растворе.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 150 × 4,6 мм, силикагель октадецилсилильный для хроматографии, 5 мкм; |
| Температура колонки | 25 °С; |
| Скорость потока | 0,85 мл/мин; |
| Детектор | спектрофотометрический, 360 нм; |
| Объём пробы | 20 мкл; |
| Время хроматографирования | 12 мин. |

Хроматографируют раствор стандартного образца рутозида тригидрата и испытуемый раствор.

*Пригодность хроматографической системы*. Хроматографическая система считается пригодной, если на хроматограмме раствора стандартного образца рутозида тригидрата:

– *фактор асимметрии* *пика (AS)* рутозида должен быть не более 2,0.

– *относительное стандартное отклонение* площади пика рутозида должно быть не более 2,0 % (6 определений);

– *эффективность хроматографической колонки (N)*, рассчитанная по пику рутозида, должна составлять не менее 2000 теоретических тарелок.

Содержание рутозида C27H30O16 в препарате в процентах от заявленного количества (X) вычисляют по формуле:

Х=,

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | S1 | – | площадь пика рутозида на хроматограмме испытуемого раствора; |
|  | S0 | – | площадь пика рутозида на хроматограмме раствора стандартного образца рутозида тригидрата; |
|  | a1 | – | навеска порошка растёртых таблеток, мг; |
|  | a0 | – | навеска стандартного образца рутозида тригидрата, мг; |
|  | F | – | фактор разведения раствора стандартного образца рутозида тригидрата; |
|  | P | – | содержание рутозида тригидрата в стандартном образце рутозида тригидрата, %. |
|  | G | – | средняя масса одной таблетки, мг. |
|  | L | – | заявленное количество рутозида в одной таблетке, мг; |
|  | 664,6 | – | молекулярная масса рутозида тригидрата; |
|  | 610,5 | – | молекулярная масса рутозида. |

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

Буферный раствор. Растворяют 5 г калия дигидрофосфата в 800 мл воды и доводят pH раствора фосфорной кислотой концентрированной до 2,70±0,05. Полученный раствор переносят в мерную колбу и доводят объем раствора водой до метки.

Подвижная фаза (ПФ). Метанол—Буферный раствор 100:900.

Испытуемый раствор. Точную навеску порошка растертых таблеток, соответствующую не менее 2,8 мг и не более 14,6 мг кальция пантотената, помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 80 мл воды, взбалтывают до полного смачивания порошка, обрабатывают ультразвуком в течение 20 мин, охлаждают до комнатной температуры, доводят объем раствора водой до метки и фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм. При необходимости полученный раствор дополнительно разводят водой до ожидаемой концентрации кальция пантотената около 0,028 мг/мл.

Раствор стандартного образца кальция пантотената. Около 70 мг (точная навеска) стандартного образца кальция пантотената, предварительно высушенного в течение 3 ч при температуре 105 °С, помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 30 мл воды и доводят объем раствора водой до метки. В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 1,0 мл полученного раствора, доводят объем раствора водой до метки и фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм.

Срок годности раствора – не более 8 ч.

*Хроматографические условия:*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 150 х 4,6 мм, силикагель октадецилсилильный для хроматографии, 5 мкм; |
| Температура колонки | 25 °С; |
| Детектор | спектрофотометрический, 205 нм; |
| Объем пробы | 20 мкл; |
| Скорость потока | 1,0 мл/мин; |
| Время хроматографирования | 10 мин. |

Хроматографируют раствор стандартного образца кальция пантотената и испытуемый раствор.

*Пригодность хроматографической системы*. Хроматографическая система считается пригодной, если на хроматограмме раствора стандартного образца кальция пантотената:

– *фактор асимметрии* *пика (AS)* пантотеновой кислоты должен быть не более 2,0.

– *относительное стандартное отклонение* площади пика пантотеновой кислоты должно быть не более 5,0 % (6 определений);

– *эффективность хроматографической колонки (N)*, рассчитанная по пику пантотеновой кислоты, должна составлять не менее 5000 теоретических тарелок.

Содержание кальция пантотената C18H32CaN2O10 в препарате в процентах от заявленного количества (X) вычисляют по формуле:

Х=,

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | S1 | – | площадь пика пантотеновой кислоты на хроматограмме испытуемого раствора; |
|  | S0 | – | площадь пантотеновой кислоты на хроматограмме раствора кальция пантотената; |
|  | a1 | – | навеска порошка растёртых таблеток, мг; |
|  | a0 | – | навеска стандартного образца кальция пантотената, мг; |
|  | F | – | фактор разведения испытуемого раствора; |
|  | P | – | содержание кальция пантотената в стандартном образце кальция пантотената, %. |
|  | G | – | средняя масса одной таблетки, мг. |
|  | L | – | заявленное количество кальция пантотената в одной таблетке, мг. |

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

Все растворы защищают от действия света, используют посуду из темного стекла.

Буферный раствор. Растворяют 2 г калия дигидрофосфата в 800 мл воды и доводят pH раствора фосфорной кислотой концентрированной до 3,00±0,05. Полученный раствор переносят в мерную колбу вместимостью 1 л и доводят объем раствора водой до метки.

Подвижная фаза (ПФ). Метанол—Буферный раствор 100:300.

*Натрия эдетата раствор.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 10 г натрия эдетата, прибавляют 70 мл воды и растворяют при нагревании на водяной бане при температуре 50-60 °С, периодически встряхивая, охлаждают до комнатной температуры и доводят объем раствора водой до метки.

Испытуемый раствор. Точную навеску порошка растертых таблеток, соответствующую не менее 3,2 мкг и не более 6,3 мкг цианокобаламина, помещают в химический стакан вместимостью 50 мл и медленно, при непрерывном перемешивании прибавляют 3 порции по 5 мл натрия эдетата раствора, осторожно перемешивают до полного смачивания порошка. После окончания реакции газообразования раствор обрабатывают ультразвуком в течение 10 мин, охлаждают до комнатной температуры. Содержимое стакана количественно переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл с использованием необходимого количества натрия эдетата раствора и доводят объем раствора натрия эдетата раствором до метки. Полученный раствор переносят в центрифужную пробирку вместимостью 15 мл и центрифугируют при 8000 об/мин в течение 15 мин, надосадочную жидкость фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм.

Раствор используют сразу после приготовления.

Раствор стандартного образца цианокобаламина. Около 25 мг (точная навеска) стандартного образца цианокобаламина помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 80 мл воды и доводят объем раствора водой до метки. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 5,0 мл полученного раствора и доводят объем раствора водой до метки. При необходимости полученный раствор дополнительно разводят натрия эдетата раствором до концентрации, соответствующей ожидаемому содержанию цианокобаламина в испытуемом растворе.

Срок годности раствора – не более 8 ч.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка: | 150 х 4,6 мм, силикагель октадецилсилильный для хроматографии, 5 мкм; |
| Температура колонки: | 25 °С; |
| Детектор: | спектрофотометрический, 550 нм; |
| Объем пробы: | 100 мкл; |
| Скорость потока: | 0,75 мл/мин; |
| Время хроматографирования | 7 мин. |

Хроматографируют раствор стандартного образца цианокобаламина и испытуемый раствор.

*Пригодность хроматографической системы*. Хроматографическая система считается пригодной, если на хроматограмме раствора стандартного образца цианокобаламина:

– *фактор асимметрии* *пика (AS)* цианокобаламина должен быть не более 2,0.

– *относительное стандартное отклонение* площади пика цианокобаламина должно быть не более 5,0 % (6 определений);

– *эффективность хроматографической колонки (N)*, рассчитанная по пику цианокобаламина, должна составлять не менее 1000 теоретических тарелок.

Содержание цианокобаламина C63H88CoN14O14P в препарате в процентах от заявленного количества (X) вычисляют по формуле:

*Х*=,

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | S1 | – | площадь пика цианокобаламина на хроматограмме испытуемого раствора; |
|  | S0 | – | площадь цианокобаламина на хроматограмме раствора цианокобаламина; |
|  | a0 | – | навеска стандартного образца цианокобаламина, мг; |
|  | a1 | – | навеска порошка растёртых таблеток, мг; |
|  | F | – | фактор разведения раствора стандартного образца цианокобаламина; |
|  | P | – | содержание цианокобаламина в стандартном образце цианокобаламина, %. |
|  | G | – | средняя масса одной таблетки, мг. |
|  | L | – | заявленное количество цианокобаламина в одной таблетке, мг. |

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

Все растворы защищают от действия света, используют посуду из темного стекла.

Буферный раствор. Растворяют 2 г калия дигидрофосфата в 800 мл воды и доводят pH раствора фосфорной кислотой концентрированной до 2,70±0,05. Полученный раствор переносят в мерную колбу вместимостью 1 л и доводят объем раствора водой до метки.

Подвижная фаза (ПФ). Буферный раствор—ацетонитрил 700:300.

Испытуемый раствор. Точную навеску порошка растертых таблеток, соответствующую не менее 0,59 мг и не более 0,99 мг тиоктовой кислоты, помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 20 мл смеси ацетонитрил⎯вода 1:1, перемешивают, обрабатывают ультразвуком в течение 10 мин, охлаждают до комнатной температуры, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм.

Раствор стандартного образца тиоктовой кислоты. Около 25 мг (точная навеска) стандартного образца тиоктовой кислоты помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 25 мл ацетонитрила и доводят объем раствора смесью ацетонитрил⎯вода 1:1 до метки. При необходимости полученный раствор дополнительно разводят смесью ацетонитрил⎯вода 1:1 до концентрации, соответствующей ожидаемому содержанию тиоктовой кислоты в испытуемом растворе.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 150 х 4,6 мм, силикагель октадецилсилильный для хроматографии, 5 мкм; |
| Температура колонки | 25 °С; |
| Детектор | спектрофотометрический, 220 нм; |
| Объем пробы | 20 мкл; |
| Скорость потока | 1,0 мл/мин; |
| Время хроматографирования | 12 мин. |

Хроматографируют раствор стандартного образца тиоктовой кислоты и испытуемый раствор.

*Пригодность хроматографической системы*. Хроматографическая система считается пригодной, если на хроматограмме раствора стандартного образца цианокобаламина:

– *фактор асимметрии* *пика (AS)* тиоктовой кислоты должен быть не более 2,0.

– *относительное стандартное отклонение* площади пика тиоктовой кислоты должно быть не более 5,0 % (6 определений);

– *эффективность хроматографической колонки (N)*, рассчитанная по пику тиоктовой кислоты, должна составлять не менее 2000 теоретических тарелок.

Содержание тиоктовой кислоты C8H14O2S2 в препарате в процентах от заявленного количества (X) вычисляют по формуле:

*Х*=,

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | S1 | – | площадь пика тиоктовой кислоты на хроматограмме испытуемого раствора; |
|  | S0 | – | площадь тиоктовой кислоты на хроматограмме раствора тиоктовой кислоты; |
|  | a1 | – | навеска порошка растёртых таблеток, мг; |
|  | a0 | – | навеска стандартного образца тиоктовой кислоты, мг; |
|  | F | – | фактор разведения раствора стандартного образца тиоктовой кислоты; |
|  | P | – | содержание тиоктовой кислоты в стандартном образце тиоктовой кислоты, %. |
|  | G | – | средняя масса одной таблетки, мг. |
|  | L | – | заявленное количество тиоктовой кислоты в одной таблетке, мг. |

*Лютеин.* Определение проводят методом спектрофотометрии (ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях»).

Все растворы защищают от действия света, используют посуду из темного стекла.

Испытуемый раствор. Точную навеску порошка растертых таблеток, соответствующую около 3,45 мг лютеина, помещают в коническую колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 25 мл аммиака раствора 10 %, 15 мл спирта 96 % и нагревают на водяной бане при температуре 60-65 °С и перемешивании в течение 10 мин. Полученный раствор охлаждают до комнатной температуры, прибавляют 25 мл смеси гексан⎯этилацетат 1:2, обрабатывают ультразвуком в течение 20 мин, при температуре 25 ± 5 °С и встряхивают в течение 15 мин. Полученный раствор количественно переносят с использованием необходимого количества смеси гексан⎯этилацетат 1:2 в делительную воронку вместимостью 100 мл и оставляют до полного разделения слоев. Нижний слой отбрасывают. Верхний органический слой фильтруют через бумажный фильтр с 3 г натрия сульфата безводного в мерную колбу вместимостью 100 мл, фильтр промывают смесью гексан⎯этилацетат 1:2. Смывы и фильтрат помещают в ту же мерную колбу и доводят объем раствора смесью гексан⎯этилацетат 1:2 до метки. В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 1,0 мл полученного раствора и доводят объем раствора смесью гексан⎯этанол 3:1 до метки.

Измеряют оптическую плотность испытуемого раствора на спектрофо­тометре в максимуме поглощения при длине волны 452 нм в кювете с тол­щиной слоя 1 см. В качестве раствора сравнения используют смесь: гексан⎯этанол 3:1.

Содержание лютеина в процентах (*Х*) вычисляют по формуле:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | A | − | оптическая плотность испытуемого раствора; |
|  | а | − | навеска порошка растертых таблеток, мг; |
|  | 2550 | − | удельный показатель поглощения лютеина (); |
|  | G | – | средняя масса одной таблетки, мг. |

*Железо.* Определение проводят методом атомно-абсорбционной спектрометрии (ОФС «Атомно-абсорбционная спектрометрия»).

Испытуемый раствор. Точную навеску порошка растертых таблеток, соответствующую около 25 мг железа, помещают в мерную колбу вместимостью 500 мл, прибавляют 100 мл воды, 25 мл хлористоводородной кислоты концентрированной, перемешивают в течение 15 мин, доводят объем раствора водой до метки и фильтруют, отбрасывая первые 10 мл фильтрата. В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 5,0 мл полученного фильтрата и доводят объем раствора водой до метки.

Стандартный раствор железа 0,1 мг/мл. Используют готовый раствор стандартного образца железа с аттестованным значением концентрации железа 1 мг/мл в азотной или хлористоводородной кислоте с массовой долей кислоты не менее 1 %. Готовый раствор стандартного образца железа разводят водой до концентрации железа 0,1 мг/мл.

Стандартный раствор железа 0,01 мг/мл. В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 5,0 мл стандартного раствора железа 0,1 мг/мл и доводят объем раствора водой до метки.

Срок годности раствора – не более 8 ч.

*Условия испытания*

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Источник излучения |  | лампа для определения железа; |
| Атомизация |  | ацетилен—воздушное пламя; |
| Расход газа |  | воздух – 500 л/ч,  ацетилен – 80 л/ч; |
| Длина волны |  | 248,3 нм. |

Измеряют поглощение стандартного раствора железа 0,01 мг/мл и испытуемого раствора. В качестве раствора сравнения используют воду.

Содержание железа в препарате в процентах от заявленного количества (*Х*) вычисляют по формуле:

*Х=,*

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | A0 | − | поглощение испытуемого раствора; |
|  | A1 | – | поглощение стандартного раствора железа 0,01 мг/мл; |
|  | a1 | − | навеска порошка растертых таблеток, мг; |
|  | 0,01 | − | содержание железа в стандартном растворе железа, мг/мл; |
|  | L | – | заявленное количество железа в одной таблетке, мг |
|  | G | – | средняя масса одной таблетки, мг. |

*Марганец.* Определение проводят методом атомно-абсорбционной спектрометрии (ОФС «Атомно-абсорбционная спектрометрия»).

Испытуемый раствор. Точную навеску порошка растертых таблеток, соответствующую около 5 мг марганца, помещают в мерную колбу вместимостью 500 мл, прибавляют 100 мл воды, 25 мл хлористоводородной кислоты концентрированной, перемешивают в течение 15 мин, доводят объем раствора водой до метки и фильтруют, отбрасывая первые 10 мл фильтрата. В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 25 мл полученного фильтрата и доводят объем раствора водой до метки.

Стандартный раствор марганца 0,1 мг/мл. Используют готовый раствор стандартного образца марганца с аттестованным значением концентрации марганца 1 мг/мл в азотной или хлористоводородной кислоте с массовой долей кислоты не менее 1 %. Готовый раствор стандартного образца марганца разводят водой до концентрации марганца 0,1 мг/мл.

*Раствор* стандартного образца *марганца 0,005 мг/мл.* В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 2,5мл стандартного раствора марганца 0,1 мг/мл и доводят объем раствора водой до метки.

Срок годности раствора – не более 8 ч.

*Условия испытания*

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Источник излучения |  | лампа для определения марганца; |
| Атомизация |  | ацетилен—воздушное пламя; |
| Расход газа |  | воздух – 500 л/ч,  ацетилен – 80 л/ч; |
| Длина волны |  | 279,5 нм. |

Измеряют поглощение стандартного раствора марганца 0,005 мг/мл и испытуемого раствора. В качестве раствора сравнения используют воду.

Содержание марганца в препарате в процентах от заявленного количества (*Х*) вычисляют по формуле:

*Х=,*

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | A0 | − | поглощение испытуемого раствора; |
|  | A1 | – | поглощение стандартного раствора марганца 0,005 мг/мл; |
|  | a1 | − | навеска порошка растертых таблеток, мг; |
|  | 0,005 | − | содержание марганца в стандартном растворе марганца, мг/мл; |
|  | L | – | заявленное количество марганца в одной таблетке, мг |
|  | G | – | средняя масса одной таблетки, мг. |

*Медь.* Определение проводят методом атомно-абсорбционной спектрометрии (ОФС «Атомно-абсорбционная спектрометрия»).

Испытуемый раствор. Точную навеску порошка растертых таблеток, соответствующую около 3 мг меди, помещают в мерную колбу вместимостью 500 мл, прибавляют 100 мл воды, 25 мл хлористоводородной кислоты концентрированной, перемешивают в течение 15 мин, доводят объем раствора водой до метки и фильтруют, отбрасывая первые 10 мл фильтрата. Смешивают 50,00 мл полученного фильтрата и 10,0 мл воды.

Стандартный раствор *меди 0,1 мг/мл*. Готовят согласно методике ОФС «Атомно-абсорбционная спектрометрия». Полученный раствор разводят водой до концентрации меди 0,1 мг/мл.

Для приготовления стандартного раствора допускается использовать готовый раствор стандартного образца меди с аттестованным значением концентрации меди в азотной или хлористоводородной кислоте с массовой долей кислоты не менее 1 %.

*С*тандартный раствор *меди 0,005 мг/мл.* В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 2,5мл стандартного раствора мед 0,1 мг/мл и доводят объем раствора водой до метки.

Срок годности раствора – не более 8 ч.

*Условия испытания*

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Источник излучения |  | лампа для определения меди; |
| Атомизация |  | ацетилен—воздушное пламя; |
| Расход газа |  | воздух – 500 л/ч,  ацетилен – 80 л/ч; |
| Длина волны |  | 324,7 нм. |

Измеряют поглощение стандартного раствора меди 0,005 мг/мл и испытуемого раствора. В качестве раствора сравнения используют воду.

Содержание меди в препарате в процентах от заявленного количества (*Х*) вычисляют по формуле:

*Х=,*

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *A0* | − | поглощение испытуемого раствора; |
|  | *A1* | – | поглощение стандартного раствора меди 0,005 мг/мл; |
|  | *a1* | − | навеска порошка растертых таблеток, мг; |
|  | 0,005 | − | содержание меди в стандартном растворе меди, мг/мл; |
|  | *L* | – | заявленное количество меди в одной таблетке, мг |
|  | *G* | – | средняя масса одной таблетки, мг. |

*Цинк.* Определение проводят методом атомно-абсорбционной спектрометрии (ОФС «Атомно-абсорбционная спектрометрия»).

Испытуемый раствор. Точную навеску порошка растертых таблеток, соответствующую около 30 мг цинка, помещают в мерную колбу вместимостью 500 мл, прибавляют 100 мл воды, 25 мл хлористоводородной кислоты концентрированной, перемешивают в течение 15 мин, доводят объем раствора водой до метки и фильтруют, отбрасывая первые 10 мл фильтрата. В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 1,6 мл полученного фильтрата и доводят объем раствора водой до метки.

Стандартный раствор *цинка 0,1 мг/мл*. Готовят согласно методике ОФС «Атомно-абсорбционная спектрометрия». Полученный раствор разводят водой до концентрации цинка 0,1 мг/мл.

Для приготовления стандартного раствора допускается использовать готовый раствор стандартного образца цинка с аттестованным значением концентрации цинка в азотной или хлористоводородной кислоте с массовой долей кислоты не менее 1 %.

*С*тандартный раствор *цинка 0,002 мг/мл*. В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 1,0 мл стандартного раствора цинка 0,1 мг/мл и доводят объем раствора водой до метки.

Срок годности раствора – не более 8 ч.

*Условия испытания*

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Источник излучения |  | лампа для определения цинка; |
| Атомизация |  | ацетилен—воздушное пламя; |
| Расход газа |  | воздух – 500 л/ч,  ацетилен – 80 л/ч; |
| Длина волны |  | 213,8 нм. |

Измеряют поглощение стандартного раствора цинка 0,002 мг/мл и испытуемого раствора. В качестве раствора сравнения используют воду.

Содержание цинка в препарате в процентах от заявленного количества (*Х*) вычисляют по формуле:

*Х=,*

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *A0* | − | поглощение испытуемого раствора; |
|  | *A1* | – | поглощение стандартного раствора цинка 0,002 мг/мл; |
|  | *a1* | − | навеска порошка растертых таблеток, мг; |
|  | 0,002 | − | содержание цинка в стандартном растворе цинка, мг/мл; |
|  | *L* | – | заявленное количество цинка в одной таблетке, мг |
|  | *G* | – | средняя масса одной таблетки, мг. |

*Магний.* Определение проводят методом атомно-абсорбционной спектрометрии (ОФС «Атомно-абсорбционная спектрометрия»).

Испытуемый раствор. Точную навеску порошка растертых таблеток, соответствующую около 75 мг магния, помещают в мерную колбу вместимостью 500 мл, прибавляют 100 мл воды, 25 мл хлористоводородной кислоты концентрированной, перемешивают в течение 15 мин, доводят объем раствора водой до метки и фильтруют, отбрасывая первые 10 мл фильтрата. В мерную колбу вместимостью 200 мл помещают 2,6 мл полученного фильтрата и доводят объем раствора водой до метки.

*С*тандартный раствор *магния 0,1 мг/мл*. Используют готовый раствор стандартного образца магния с аттестованным значением концентрации магния 1 мг/мл в азотной или хлористоводородной кислоте с массовой долей кислоты не менее 1 %. Готовый раствор стандартного образца магния разводят водой до концентрации магния 0,1 мг/мл.

*С*тандартный раствор *магния 0,002 мг/мл.* В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 1,0 мл стандартного раствора магния 0,1 мг/мл и доводят объем раствора водой до метки.

Срок годности раствора – не более 8 ч.

*Условия испытания*

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Источник излучения |  | лампа для определения магния; |
| Атомизация |  | ацетилен—воздушное пламя; |
| Расход газа |  | воздух – 500 л/ч,  ацетилен – 80 л/ч; |
| Длина волны |  | 285,2 нм. |

Измеряют поглощение стандартного раствора магния 0,002 мг/мл и испытуемого раствора. В качестве раствора сравнения используют воду.

Содержание магния в препарате в процентах от заявленного количества (*Х*) вычисляют по формуле:

*Х=,*

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *A0* | − | поглощение испытуемого раствора; |
|  | *A1* | – | поглощение стандартного раствора магния 0,002 мг/мл; |
|  | *a1* | − | навеска порошка растертых таблеток, мг; |
|  | 0,002 | − | содержание цинка в стандартном растворе магния, мг/мл; |
|  | *L* | – | заявленное количество магния в одной таблетке, мг |
|  | *G* | – | средняя масса одной таблетки, мг. |

*Кальций.* Определение проводят методом атомно-абсорбционной спектрометрии (ОФС «Атомно-абсорбционная спектрометрия»).

*Лантана(III) нитрата раствор.* В мерную колбу вместимостью 1 л помещают 155,8 г лантана(III) нитрата, растворяют в воде и доводят объем раствора водой до метки.

Стронция нитрата раствор. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 10 г стронция нитрата, растворяют в воде и доводят объем раствора водой до метки.

Испытуемый раствор. Точную навеску порошка растертых таблеток, соответствующую около 0,25 г кальция, помещают в мерную колбу вместимостью 500 мл, прибавляют 100 мл воды, 25 мл хлористоводородной кислоты концентрированной, перемешивают в течение 15 мин, доводят объем раствора водой до метки и фильтруют, отбрасывая первые 10 мл фильтрата. В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 0,8 мл полученного фильтрата, прибавляют 12,5 мл лантана (III) нитрата раствора, 1,0 мл стронция нитрата раствора, перемешивают и доводят объем раствора водой до метки.

Стандартный раствор кальция 0,1 мг/мл. Готовят согласно методике ОФС «Атомно-абсорбционная спектрометрия». Полученный раствор разводят водой до концентрации кальция 0,1 мг/мл.

Примечание

Для приготовления стандартного раствора допускается использовать готовый раствор стандартного образца цинка с аттестованным значением концентрации цинка в азотной или хлористоводородной кислоте с массовой долей кислоты не менее 1 %.

*Стандартный раствор* *кальция 0,005 мг/мл.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 5,0 мл стандартного раствора кальция 0,1 мг/мл, прибавляют 25,0 мл лантана(III) нитрата раствора или 2,0 мл стронция нитратараствора или стронция хлорида раствора, перемешивают и доводят объем раствора водой до метки.

Срок годности раствора – не более 8 ч.

Контрольный раствор. В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 6,2 мл лантана(III) нитрата раствора или 0,5 мл стронция нитрата раствора и доводят объем раствора водой до метки.

Срок годности раствора – не более 8 ч.

*Условия испытания*

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Источник излучения |  | лампа для определения кальция; |
| Атомизация |  | ацетилен—воздушное пламя; |
| Расход газа |  | воздух – 500 л/ч,  ацетилен – 80 л/ч; |
| Длина волны |  | 422,7 нм. |

Измеряют поглощение стандартного раствора кальция 0,005 мг/мл, контрольного и испытуемого растворов. В качестве раствора сравнения используют воду.

Содержание кальция в препарате в процентах от заявленного количества (*Х*) вычисляют по формуле:

*Х=,*

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *A0* | − | поглощение стандартного раствора магния 0,002 мг/мл; |
|  | *A1* | – | поглощение испытуемого раствора; |
|  | *A2* | – | поглощение контрольного раствора; |
|  | *a1* | − | навеска порошка растертых таблеток, мг; |
|  | 0,002 | − | содержание цинка в стандартном растворе магния, мг/мл; |
|  | *L* | – | заявленное количество магния в одной таблетке, мг |
|  | *G* | – | средняя масса одной таблетки, мг. |

*Селен.* Определение проводят методом флуориметрии (ОФС «Флуориметрия»).

2,3-Диаминонафталина раствор. В 100,0 мл хлористоводородной кислоты раствора 0,1 М растворяют 0,100 г 2,3-диаминонафталина Полученный раствор переносят в делительную воронку вместимостью 500 мл, прибавляют 15 мл гексана и встряхивают в течение 2 мин. После расслаивания жидкостей, слои разделяют. Верхний (гексановый) слой отбрасывают, нижний (водный) слой фильтруют и используют для анализа.

Раствор используют свежеприготовленным.

Натрия эдетата раствор. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 2,0 г натрия эдетата, прибавляют 80 мл воды и растворяют при нагревании на водяной бане при температуре 50-60 °С, периодически встряхивая, охлаждают до комнатной температуры, доводят объем раствора водой до метки и фильтруют.

Испытуемый раствор. Точную навеску порошка растертых таблеток, соответствующую около 9,3 мг селена помещают в химический стакан вместимостью 100 мл, прибавляют 5 мл азотной кислоты концентрированной и выпаривают до объема около 2 мл. В конце выпаривания проба должна оставаться смоченной. Прекращают нагрев, раствор осторожно встряхивают для удаления бурых паров и охлаждают до комнатной температуры. Полученный раствор количественно переносят с использованием необходимого количества воды в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят объем раствора водой до метки.

В химический стакан вместимостью 100 мл помещают 1,0 мл полученного раствора, прибавляют 3 мл хлорной кислоты и выпаривают до начала появления «густых» белых паров хлорной кислоты и остаточного объема около 3 мл. Прекращают нагревание, раствор выдерживают в течение 1 мин при комнатной температуре. Стенки стакана промывают 2 мл воды и повторно нагревают до начала появления «густых» белых паров, прекращают нагрев, полученный раствор используют для анализа.

Стандартный раствор селена 100 мкг/мл. Используют готовый раствор стандартного образца селена (IV) с аттестованным значением концентрации селена 1 мг/мл в азотной или хлористоводородной кислоте с массовой долей кислоты не менее 1 %. Готовый раствор стандартного образца селена разводят хлористоводородной кислоты раствором 0,1 М до концентрации селена 100 мкг/мл.

*С*тандартный раствор *селена 2 мкг/мл*. В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 1,0 мл стандартного раствора селена 100 мкг/мл и доводят объем раствора хлористоводородной кислоты раствором 0,1 М до метки.

Срок годности раствора – не более 8 ч.

Параллельно проводят подготовку контрольного раствора и стандартного раствора селена.

Для этого в два химических стакана вместимостью 100 мл прибавляют: в первый (контрольный раствор) – 10,0 мл воды, во второй (стандартный раствор селена) – 5,0 мл воды и 5,0 мл стандартного раствора селена 2 мкг/мл. В оба стакана прибавляют по 5 мл азотной кислоты концентрированной, 3 мл хлорной кислоты и выпаривают содержимое на электроплитке до начала появления белых «густых» паров хлорной кислоты до остаточного объема около 3 мл. Прекращают нагревание, раствор выдерживают в течение 1 мин при комнатной температуре. Стенки каждого стакана промывают порциями по 2 мл воды и вновь выпаривают до появления белых «густых» паров. Прекращают нагрев и оставляют до охлаждения раствора до комнатной температуры.

После охлаждения, содержимое обоих стаканов с использованием воды количественно переносят в мерные колбы вместимостью 50 мл и доводят объемы растворов водой до метки. По 4,0 мл контрольного раствора и стандартного раствора селена помещают в химические стаканы вместимостью 100 мл и используют для анализа.

В стаканы с испытуемым раствором, контрольным раствором и стандартным раствором селена (2 мкг/мл) прибавляют по 2,0 мл хлористоводородной кислоты концентрированной и нагревают на кипящей водяной бане в течение 10 мин, быстро охлаждают до комнатной температуры. После охлаждения к каждому раствору прибавляют по 20 мл воды, промывают водой стенки стакана и доводят pH растворов аммиака раствором 10 % до 1,00±0,05. К полученным растворам прибавляют по 4,0 мл натрия эдетата раствора, оставляют на 5 мин, прибавляют по 4,0 мл 2,3-диаминонафталина раствора, перемешивают и нагревают на кипящей водяной бане в течение 5 мин.

После охлаждения в бане с холодной водой, растворы переносят в разделительные воронки вместимостью 100 мл, прибавляют по 8 мл гексана, встряхивают содержимое в течение 1 мин и дают отстояться слоям до разделения фаз. Водную фазу отбрасывают, а органическую фазу фильтруют в градуированные пробирки с притертой пробкой вместимостью 10 мл, доводят объемы растворов до 10 мл метки гексаном.

Измеряют интенсивность флуоресценции испытуемого раствора, стандартного раствора селена и контрольного раствора на флуориметре при длине волны возбуждения – 366 нм и длине волны регистрации – 520 нм.

Содержание селена в препарате в процентах от заявленного количества (*Х*) вычисляют по формуле:

*Х=,*

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *I0* | − | интенсивность флюоресценции стандартного раствора селена; |
|  | *I1* | – | интенсивность флюоресценции испытуемого раствора; |
|  | *I2* | – | интенсивность флюоресценции контрольного раствора; |
|  | *a1* | − | навеска порошка растертых таблеток, мг; |
|  | 0,002 | − | содержание селена в стандартном растворе селена, мг/мл; |
|  | *L* | – | заявленное количество селена в одной таблетке, мг |
|  | *G* | – | средняя масса одной таблетки, мг. |

***Йод.*** Определение проводят методом титриметрии.

Натрия нитрита раствор. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 25 г натрия нитрита, прибавляют 70 мл воды, перемешивают до растворения и доводят объем раствора водой до метки.

Натрия гидроксида раствор. В фарфоровый стакан вместимостью 200 мл помещают 50 мл воды, осторожно при постоянном перемеши­вании прибавляют 50 г натрия гидроксида.

Испытуемый раствор. Точную навеску порошка, растертых таблеток, соответствующую не менее 1 мг и не более 2 мг йода помещают в фарфоровый тигель, прибавляют 5 г натрия карбоната безводного, 5 мл натрия гидроксида раствора, 10 мл спирта 96 %, тщательно перемешивают до полного смачивания порошка.

Тигель с пробой выдерживают на кипящей водяной бане в течение 30 мин, затем помещают в холодную электропечь и через каждые 15 мин повышают температуру на 50 °С, доводят температуру до 550 °С, выдерживают при этой температуре 10-15 ч до получения серой золы.

Тигель вынимают из печи, охлаждают, прибавляют 10 мл воды, переме­шивают содержимое стеклянной палочкой и осторожно кипятят в течение 10 мин.

Горячий раствор фильтруют в коническую колбу вместимостью 100 мл под вакуумом. Осадок на фильтре несколько раз промывают горячей водой. Общий объем воды – 50 мл.

В фильтрат прибавляют 10 мл хлороформа и по каплям прибавляют серную кислоту концентрированную до появления розовой окраски водного слоя, метилового оранжевого спиртового раствор 0,1 %, прибавляют еще 2 мл той же кислоты, 2 мл натрия нитрита раствора и интенсивно перемешивают вручную в течение 2 мин.

Нижний хлороформный слой должен окраситься в розово-фиолетовый цвет.

Параллельно проводят контрольный опыт.

Раствор стандартного образца калия йодида. В мерную колбу вместимостью 1 л помещают 4,186 г стандартного образца калия йодида, растворяют в свежепрокипяченной и охлажденной воде и доводят объем раствора водой до метки.

Контрольный раствор. В коническую колбу вместимостью 100 мл помещают 50 мл воды, прибавляют 1,0 мл раствора стандартного образца калия йодида, 10 мл хлороформа, 2 мл серной кислоты концентрированной, 2 мл натрия нитрита раствора и перемешивают вручную в течение 2 мин.

При максимально допустимом содержании йода в препарате (3,2 мг) окраска хлороформного слоя в испытуемом растворе должна быть равной по интенсивности окраске хлороформного слоя в контрольном растворе.

При меньшей интенсивности окраски испытуемого раствора, по сравнению с контрольным раствором, в испытуемый раствор медленно по каплям при постоянном перемешивании прибавляют раствор стандартного образца калия йодида до одинаковой окраски хлороформного слоя в испытуемом и контрольном растворах.

При минимально допустимом содержании йода в таблетках препарата (1,4 мг) объем прибавленного в испытуемый раствор раствора стандартного образца калия йодида не должен превышать 0,56 мл.

Объем калия йодида вычисляют по формуле:

*V*=

3,2 – максимально допустимое содержание йода, мг;

1,4 – минимально допустимое содержание йода, мг.

***Кальция пантотенат.*** Микробиологический метод с *Lactobacillus plantarum* ВКМ В-758 (АТСС 8014) в качестве тест-микроорганизма.

Испытуемый раствор. Точную навеску порошка тщательно растертых таблеток эквивалентную по содержанию 10 мг кальция пантотената, помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл воды, взбалтывают, доводят объем раствора водой до метки, перемешивают и фильтруют через фильтр «красная лента», отбрасывая первые 10 мл фильтрата. 20 мл фильтрата помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. 1 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Далее определение проводят в соответствии с ОФС «Определение содержания витаминов в многокомпонентных лекарственных препаратах микробиологическим методом», раздел «Определение содержания витаминов пробирочным методом».

Интенсивность роста тест-культуры в пробирках стандартного и испытуемого образцов измеряют при длине волны 540 нм в кювете с толщиной слоя 3 мм.

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

X=

где: С - содержание кальция пантотената, найденное по стандартной кривой

для шести концентраций растворов испытуемого образца с учетом всех разведений (4, 8, 16,32, 64 и 128 мкг/мл);

V, V1, V2 – разведения, мл;

а - навеска порошка растертых таблеток, г;

G - средняя масса таблетки, г;

Р - содержание основного вещества в стандартного образца кальция пантотената, %;

106 – коэффициент для пересчета, г;

L - заявленное количество кальция пантотената в одной таблетке, г.

***Цианокобаламин.*** *Микробиологический метод* с *Escherichia coli*  113 - 3 (АТСС 11105) в качестве тест - микроорганизма.

Натрия цитрата раствор 1 %. 1 г натрия цитрата помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в воде, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Раствор хранят при температуре не выше 0 °С в течение 7 сут.

Испытуемый раствор. Точную навеску порошка тщательно растертых таблеток эквивалентную по содержанию не менее 9,8 мкг и не более 25 мкг цианокобаламина, помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл или 200 мл, прибавляют 60 мл воды, взбалтывают в течение 15 мин, доводят объем раствора водой до метки, перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр «красная лента», отбрасывая первые 10 мл фильтрата.

10 мл фильтрата помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора натрия цитрата раствором 1 % до метки и перемешивают.

Определение проводят в соответствии ОФС «Определение содержания витаминов в многокомпонентных лекарственных препаратах микробиологическим методом» (определение количественного содержания витаминов чашечным методом).

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

Х=

где: С - содержание цианокобаламина в 1 мл испытуемого раствора,

найденное по стандартной кривой, мкг;

а, - навеска порошка растертых таблеток, г;

G - средняя масса таблетки, г;

К - коэффициент разведения

L - заявленное количество цианокобаламина в одной таблетке, г.

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