**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

**\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_**

**Аскорбиновая кислота+Биотин + ФС**

**Кальция пантотенат+Колекальциферол+**

**Никотинамид +Пиридоксина гидрохлорид+**

**Ретинола ацетат+Рибофлавин+Тиамина**

**мононитрат+альфа-Токоферола ацетат+**

**Фоливая кислота + Цианокобаламин +**

**Железо + Калий +Кальций +Магний +**

**Марганец+Медь+Натрий +Селен+Хром +**

**Цинк + Йод + Фосфор, таблетки жевательные**

***Ascorbic acid + Biotin + Calcium***

***Pantothenate + Colecalciferol +***

***Nicotinamide +Pyridoxine Hydrochloride +***

***Retinol Acetate + Riboflavin+Thiamine***

***Mononitrate + аlpha-Tocopherol Acetate +***

***Voliva acidum+Cyanocobalamin+Iron+***

***Kalium+Calcium+Magnesium+Manganese+***

***Copper+Sodium****+* ***Selenium + Chromium+***

***Zinc+Iodum+Phosphorus,*** ***tabulettae masticatoriae* Вводится впервые**

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

Настоящая фармакопейная статья распространяется на лекарственный препарат поливитамины + минеральные соли: Аскорбиновая кислота + Биотин+Кальция пантотенат + Колекальциферол +Никотинамид + Пиридоксина гидрохлорид + Ретинола ацетат + Рибофлавин + Тиамина мононитрат + альфаТокоферола ацетат + Фоливая кислота + Цианокобаламин + Железо + Калий + Кальций + Магний + Марганец + Медь + Натрий +Селен + Хром + Цинк + Йод + Фосфор, таблетки жевательные.

Препарат содержит от заявленного количества в таблетке не менее 90 % и не более 165 % ретинола ацетат С22Н22О2, не менее 90 % и не более 165 % колекальциферола С27Н44О, не менее 90 % и не более 165 % альфа-токоферола ацетат С31Н52О3, не менее 90 % и не более 150 % аскорбиновой кислоты С6Н8О6, не менее 90 % и не более 150 % тиамина мононитрата С12Н17N5O4S, не менее 90 % и не более 150 % рибофлавина С17Н20N4О6, не менее 90 % и не более 150 % пиридоксина гидрохлорида С8Н11NО3НCL, не менее 90 % и не более 150 % никотинамида С6Н6N2O, не менее 90 % и не более 150 % цианокобаламина С63Н88СоN14O14, не менее 90 % и не более 150 % биотина С10Н16N2O3S, не менее 90 % и не более 150 % фолиевой кислоты С19Н19N7O6, не менее 90 % и не более 150 % кальция пантотенат С18Н32СаN2O10, не менее 90 % и не более 125 % кальция, не менее 90 % и не более 125 % магния, не менее 90 % и не более 125 % железа, не менее 90 % и не более 125 % меди, не менее 90 % и не более 125 % цинка, не менее 90 % и не более 125 % марганца, не менее 90 % и не более 200 % селена, не менее 90 % и не более 200 % хрома, не менее 90 % и не более 125 % йода, не менее 90 % и не более 125 % фосфора.

Препарат должен соответствовать требованиям ОФС «Лекарственные формы», ОФС «Таблетки» и нижеприведенным требованиям.

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

**Подлинность**

***Ретинола ацетат, колекальциферола, альфа - токоферола ацетат, тиамина мононитрат, рибофлавина, пиридоксина гидрохлорид, цианокобаламина, никотинамида, биотина, фолиевая кислота, кальция пантотенат.***

*Метод ВЭЖХ.* Определение проводят в соответствии с ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография по разделу «Количественное определение».

Время удерживания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора должно соответствовать времени удерживания пика соответствующего компонента на хроматограмме стандартного раствора.

*Аскорбиновая кислота*

*Качественная реакция* с метиленовым синим в присутствии раствора спирта. Взвешивают точно количество порошка растертых таблеток, эквивалентное 0,2 г аскорбиновой кислоты и растворяют в 100 мл спирта 95 %. Полученную смесь фильтруют через бумажный фильтр; к 2 мл фильтрата прибавляют 4 капли метиленового синего, нагревают до температуры 40 °С. Раствор приобретает темно-синее окрашивание, которое значительно светлеет или исчезает через 3 мин.

***Кальций, магний, железо, медь, цинк, марганец, селен, хром.***

*Метод атомно-абсорбционной спектрометрии*. Определение проводят в соответствии с ОФС «Атомно - абсорбционная спектрометрия» по разделу «Количественное определение».

Последовательно определяют поглощение стандартных и испытуемых растворов:

на эмиссионной длине волны кальция - 422,7 нм;

на эмиссионной длине волны магния - 285,2 нм;

на эмиссионной длине волны железа - 248,3 нм;

на эмиссионной длине волны меди — 324,7 нм;

на эмиссионной длине волны цинка - 213,8 нм;

на эмиссионной длине волны марганца - 279,5 нм;

на эмиссионной длине волны селена - 196 нм;

на эмиссионной длине волны хрома — 357,9 нм

Максимумы поглощения испытуемого и раствора стандартного образца должны иметь одну длину волны.

***Фосфор***

*Метод спектрофотометрии***.** Определение проводят в соответствии сОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях» по разделу «Количественное определение».

УФ – спектр испытуемого раствора должен иметь максимум поглощения при той же длине волны, что и УФ – спектра раствора стандартного образца.

***Йод***

*Титриметрический метод***.** Определение проводят по разделу Количественное определение. Образуется синее окрашивание раствора.

**Однородность массы.** Должен соответствовать требованиям ОФС «Однородность массы дозированных лекарственных форм».

**Микробиологическая чистота**. Должен соответствовать требованиям ОФС «Микробиологическая чистота».

**Количественное определение**

***Ретинола ацетат***

*Метод ВЭЖХ (ОФС Высокоэффективная жидкостная хроматография)*

Подвижная фаза: н-гексан.

Испытуемый раствор. Навеску порошка, эквивалентную массе 5 таблеток, переносят в колбу с завинчивающейся крышкой, прибавляют 10 мл диметилсульфоксида и около 45 мл н-гексана, помещают на водяную баню при температуре 60° С на 45 мин, периодически встряхивая. Полученный раствор центрифугируют при 3000 об/мин в течение 10 мин, удаляют слой н-гексана с помощью пипетки в мерную колбу вместимостью 100 мл. К оставшемуся слою диметилсульфоксида прибавляют 15 мл н-гексана, перемешивают в течение 5 мин при температуре 15 – 25 °С и удаляют слой н-гексана. Эту операцию повторяют еще три раза, каждый раз прибавляя по 15 мл н-гексана. Объединенные гексановые извлечения, собирают в ту же мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора н- гексаном до метки и перемешивают.

20 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора н-гексаном до метки и перемешивают (концентрация полученного раствора около 15 мкг ретинола ацетата в мл). Оставшийся раствор сохраняют для последующего использования при количественном определении колекальциферола и альфа-токоферола ацетата.

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

*Раствор для проверки пригодности хроматографической системы (*раствор ретинола пальмитата в н-гексане 15 мкг/мл). В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают около 15 мг (точная навеска) ретинола пальмитата, растворяют в н-гексане, доводят объем раствора до метки этим же растворителем и перемешивают. 25 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл доводят объем раствора раствором стандартного образца и перемешивают. Полученный раствор имеет концентрацию 7,5 мкг ретинола ацетата в 1 мл и 7,5 мг ретинола пальмитата в 1 мл.

Условия хроматографирования

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

Хроматографируют раствор для проверки пригодности хроматографической системы.

*Пригодность хроматографической системы*

- *фактор разрешения* *(Rs)* между пиками ретинола ацетата и ретинола пальмитата должен быть не менее 10;

- *относительное стандартное отклонение* площади пиков при повторных введенийдолжно быть не более 3 % (6 определений).

Хроматографируют раствор стандартного образца и испытуемый раствор.

Вычисляют содержание ретинола ацетата в мг в пересчете на ретинол (Х) в одной таблетке по формуле:

Х =

где: S1 – площадь пика ретинола ацетата на хроматограмме испытуемого раствора;

So – площадь пика ретинола ацетата на хроматограмме раствора стандартного образца;

а1 – навеска порошка таблеток для приготовления испытуемого раствора, мг;

аo – навеска порошка таблеток для приготовления раствора стандартного образца, мг;

G - средняя масса таблеток, мг;

0,872 – фактор пересчета ретинола ацетата в ретитол.

Содержание ретинола ацетата (Y) в МЕ вычисляют по формуле:

Y =

где: Х - содержание ретинола ацетата в мг.

1 МЕ активности ретинола ацетата соответствует 0,3 мкг ретинола.

***Колекальциферол***

*Метод ВЭЖХ (ОФС Высокоэффективная жидкостная хроматография)*

*Подвижная фаза:* отфильтрованная и дегазированная смесь н-гексана и изопропилового спирта в соотношении 99:1 (об/об).

*Испытуемый раствор.* 20 мл испытуемого раствора, приготовленного в разделе «Количественное определение ретинола ацетата» помещают в подходящую колбу. Содержимое колбы упаривают в вакууме, при температуре 15 - 25 °С, досуха и растворяют остаток в 5 мл н-гексана. Полученный раствор должен иметь концентрацию около 2 мкг колекальциферола в мл.

*Раствор стандартного образца.* В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают около 2 мг (точная навеска) раствора стандартного образца колекальциферола, доводят объем раствора н-гексаном до метки и перемешивают. Полученный раствор имеет концентрацию колекальциферола около 2 мкг/мл.

Раствор для проверки пригодности хроматографической системы: Раствор стандартного образца нагревают при температуре 60°С в течение 1 ч для частичной изомеризации колекальциферола до его предшественника.

Условия хроматографирования

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 4,6 х 150 мм мономолекулярный слой аминопропилсилана, химически связанный с пористыми частицами силикагеля, 3 мкм |
| Температура колонки | 20 °С |
| Детектор | спектрофотометрический, 265 нм |
| Скорость потока | 1 мл/мин |
| Объем пробы | 100 мкл |

Вводят в хроматограф раствор для проверки пригодности хроматографической системы и записывают хроматограмму.

*Пригодность хроматографической системы*

- *фактор разрешения* *(Rs)* между пиками колекальциферола и его предшественником должно быть не менее 10.

- *относительное стандартное отклонение* для повторных введений стандартного раствора не должно быть более 3,0 % (6 определений)

Вводят в хроматограф раствор стандартного образца и испытуемый раствор.

Содержание колекальциферола в мг (X) в одной таблетке вычисляют по формуле:

Х =

где: S1 – площадь пика колекальциферола на хроматограмме испытуемого раствора;

So – площадь пика колекальциферола на хроматограмме стандартного раствора;

аo – навеска колекальциферола для приготовления раствора стандартного образца, мг;

а1 – навеска колекальциферола для приготовления раствора испытуемого раствора, мг;

G – средняя масса таблеток, мг;

1,09 – коэффициент коррекции, используемый для учета среднего количества предшественника колекальциферола.

Содержание колекальциферола (Y) в МЕ вычисляют по формуле:

Y= ,

где: Х - содержание колекальциферола в одной таблетке, мг;

1 МЕ активности колекальциферола соответствует 0,025 мкг колекальциферола.

***Альфа-токоферола ацетат***

*Метод ВЭЖХ (ОФС Высокоэффективная жидкостная хроматография)*

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

*Мобильная фаза.* Смесь метанола и раствораА в соотношении 95:5.

Испытуемый раствор. 4 мл раствора А, полученного в разделе «Ретинола ацетат, количественно переносят в подходящую колбу, содержимое колбы упаривают в вакууме досуха при температуре (18-20 °С). Сухой остаток при помощи метанола переносят в мерную колбу вместимостью 10 мл. Доводят объем раствора метанолом до метки и перемешивают (около 0,6 мг альфа- токоферола ацетата в мл).

*Стандартный раствор* альфа-токоферола ацетата.В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают около 30,0 мг (точная навеска) стандартного образца альфа-токоферола ацетата, растворяют в метаноле, 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. В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают около 0,65 г (точная навеска) стандартного образца эргокальциферола, растворяют в метаноле, доводят объем раствора метанолом до метки и перемешивают. 1 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, содержащую 100 мг стандартного образца альфа - токоферола ацетата, прибавляют 30 мл метанола, обрабатывают ультразвуком (при необходимости) до растворения стандартного образца альфа-токоферола ацетата, охлаждают до температуры (18-20°С), доводят объем раствора метанолом до метки и перемешивают. Полученный раствор хранят при температуре от 2 до 8 °С.

Условия хроматографирования

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 8,0 х 100 мм октадецилсилан, химически связанный с пористым силикагелем или керамическими микрочастицами, 5 мкм |
| Температура колонки | 20 °С |
| Детектор | спектрофотометрический, 254 нм |
| Скорость потока | 2 мл/мин |
| Объем пробы | 200 мкл |

Вводят в хроматограф раствор для проверки пригодности хроматографической системы и записывают хроматограмму.

*Пригодность хроматографической системы*

- *фактор разрешения* *(Rs)* между пиками эргокальциферола и альфа-токоферола ацетата должен быть не менее 12;

- *относительное стандартное отклонение* для повторных введений раствора стандартного образцца не должно быть более 3,0 % (6 определений);

- фактор асимметрии (АS) должен быть в пределах 0,8 - 1,2.

Вводят в хроматограф раствор стандартного образца и испытуемый раствор.

Содержание альфа-токоферола ацетата в мг (Х) в таблетке вычисляют по формуле:

X =

где :S1 - площадь пика альфа-токоферола ацетата на хроматограмме испытуемого раствора;

So - площадь пика альфа-токоферола ацетата на хроматограмме стандартного раствора;

ao - навеска стандартного образца альфа-токоферола ацетата для приготовления стандартного раствора, мг;

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

G — средняя масса таблеток, мг;

1 ME активности витамина Е соответствует 1 мг альфа-токоферола ацетата.

***Аскорбиновая кислота***

*Титриметрический метод*

Метафосфорно-уксусная кислота. Вмерную колбу вместимостью 500 мл помещают 16 г ортофосфорной кислоты, растворяют в 40 мл ледяной уксусной кислоты, доводят объема раствора водой до метки и перемешивают.

Стандартный раствор дихлорфенола-индофенола. В мерную колбу вместимостью 200 мл помещают 50 мг 2,6-дихлорфенол-индофенол натрия, прибавляют 50 мл воды, содержащей 42 мг натрия бикарбоната, тщательно встряхивают до растворения, доводят объем раствора водой до метки, перемешивают и фильтруют во флакон из янтарного стекла с притертой пробкой.

Раствор стандартизуют следующим образом: около 50,0 мг (точная навеска) стандартного образца аскорбиновой кислоты помещают в мерную колбу с притертой пробкой вместимостью 50 мл, растворяют в достаточном объеме метафосфорно-уксусной кислоты, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают. В коническую колбу вместимостью 50 мл, содержащую 5 мл метафосфорно-уксусной кислоты, помещают 2 мл раствора аскорбиновой кислоты, перемешивают и быстро титруют раствором дихлорфенола-индофенола до появления розовой окраски, не исчезающей в течение не менее чем 5 сек. Вносят поправку в полученный результат, получив ее путем титрования смеси 7 мл метафосфорно-уксусной кислоты и объема воды, равного объему раствора дихлорфенола-индофенола, использованному для титрования раствора аскорбиновой кислоты. Выражают концентрацию стандартного раствора в переводе на его эквивалент в мг аскорбиновой кислоты.

В мерную колбу вместимостью 200 мл, помещают навеску порошка, эквивалентную 100 мг аскорбиновой кислоты (точная навеска) и прибавляют 75 мл метафосфорно-уксусной кислоты. Колбу закрывают пробкой и встряхивают в течение 30 мин. Раствор доводят водой до метки и перемешивают. Часть раствора переносят в центрифужную пробирку и центрифугируют до получения прозрачной надосадочной жидкости. 4 мл полученного раствора переносят в коническую колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 5 мл метафосфорно-уксусной кислоты и титруют раствором дихлорфенола-индофенола до появления розовой окраски раствора, не исчезающей не менее 5 сек. Вносят поправку в полученный результат, вычисленную путем титрования смеси 15 мл воды и 5,5 мл метафосфорно-уксусной кислоты. Выражают концентрацию стандартного раствора в переводе на его эквивалент в мг аскорбиновой кислоты.

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

где: V1 – объем раствора дихлорфенола-индофенола, пошедший на титрование испытуемого раствора, мл;

V2 – объем раствора дихлорфенола-индофенола, пошедший на титрование контрольного раствора, мл;

Т – количество аскорбиновой кислоты (мг), соответствующее 1 1 мл 0,005 Н раствору дихлорфенола-индофенола

G – средняя масса таблетки, мг;

a1 - навеска порошка таблеток испытуемого препарата, мг

Каждый 1 мл раствора дихлорфенола-индофенола, пошедший на титрование, эквивалентен 0,1 мг аскорбиновой кислоты.

**Тиамина мононитрат, рибофлавин, пиридоксина гидрохлорид, никотинамид**

Метод ВЭЖХ (ОФС «Высоэффективная жидкостная хроматография высокого давления»).

Растворитель. Вода, ацетонитрил и ледяная уксусная кислота в

соотношении 94:5:1 (об/об/об).

Подвижная фаза. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 140 мг 1-гексансульфоната натрия и доводят объем раствора смесью, состоящей из: воды, метанола и ледяной уксусной кислоты в соотношении 73:27:1 (об/об/об) до метки.

Испытуемый раствор. Точное количество порошка, эквивалентное по содержанию 50,00 мг никотинамида; 3,90 мг пиридоксина гидрохлорида; 4,44 мг рибофлавина и 3,90 мг тиамина мононитрата помещают в пробирку для центрифугирования вместимостью 50 мл, прибавляют 25 мл растворителя, и перемешивают около 30 сек до полного растворения порошка. Пробирку помещают в водяную баню и нагревают в течение 5 мин при температуре (65-70°С), перемешивают в течение 30 сек и повторяют эту операцию еще раз. Содержимое пробирки центрифугируют в течение 30 сек до получения прозрачной надосадочной жидкости. Надосадочный жидкость фильтруют через мембранный фильтр 0,45 мкм и используют фильтрат в качестве испытуемого раствора. Раствор необходимо использовать в течение 3 ч после приготовления.

Раствор стандартного образца. В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают около 100 мг (точная навеска) стандартного образца никотинамида, около 8 мг (точная навеска) стандартного образца пиридоксина гидрохлорида, около 9 мг (точная навеска) стандартного образца рибофлавина, около 8 мг (точная навеска) стандартного образца тиамина гидрохлорида и прибавляют около 40 мл смеси растворителей. Нагревают на водяной бане при температуре (65-70)°С, регулярно помешивая до полного растворения (около 10 мин). Затем быстро охлаждают до температуры около 25 °С и разводят смесью растворителей до метки, перемешивают.

Условия хроматографирования

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 3,9 х 300 мм октадецилсилан, химически связанный с пористым силикагелем или керамическими микрочастицами, 5 мкм |
| Температура колонки | 20 °С |
| Детектор | спектрофотометрический, 280 нм |
| Скорость потока | 1 мл/мин |
| Объем пробы | 10 мкл |

Относительное время удерживания: никотинамида – 0,3 мин

пиридоксина гидрохлорида - 0,5 мин

рибофлавина – 0,8 мин

тиамина мононитрата – 1,0 мин

Пригодность хроматографической системы:

- относительное стандартное отклонение стандартного раствора не должно превышать 3,0 % (6 определений);

- разрешение *(R)* между пиками должно быть не менее 1;

- фактор ассиметрии *(As)* пиков должен быть не более 3;

- точность системы (*SR*) должна быть не более 3 % (6 определений).

Проводят определение раствора стандартного образца и испытуемого раствора и вычисляют содержание никотинамида, пиридоксина гидрохлорида, рибофлавина, тиамина гидрохлорида по формулам приведенным ниже.

Содержание пиридоксина гидрохлорида, рибофлавина, никотинамида в мг (Х) в одной таблетке вычисляют по формуле:

,

где: S1 – площадь пика пиридоксина гидрохлорида, рибофлавина, никотинамида на хроматограмме испытуемого раствора;

So – площадь пика пиридоксина гидрохлорида, рибофлавина, никотинамида на хроматограмме раствора стандартного образца;

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

ao - навеска стандартного образца пиридоксина гидрохлорида, рибофлавина, никотинамида для приготовления раствора стандартного образца, мг;

G - средняя масса таблеток, мг.

Содержание тиамина мононитрата в мг (Х) в одной таблетке вычисляют по формуле:

где: S1 – площадь пика тиамина мононитрата на хроматограмме испытуемого раствора;

So – площадь пика тиамина мононитрата на хроматограмме раствора стандартного образца;

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

ao - навеска стандартного образца тиамина мононитрата для приготовления раствора стандартного образца,мг;

G - средняя масса таблеток, мг;

0,9706 – коэффициент пересчета (отношение молекулярной массы тиамина гидрохлорида к молекулярной массе тиамина мононитрата).

***Цианокобаламин***

Метод ВЭЖХ (ОФС «Высоэффективная жидкостная хроматография высокого давления»).

*Подвижная* фаза. Смесь метанола и воды в соотношении 35:65 (об/об).

Испытуемый раствор. В мерную колбу вместимостью 250 мл помещают навеску порошка растертых таблеток, эквивалентную по содержанию 100 мкг цианокобаламина (точная навеска), прибавляют 100 мл воды и встряхивают в течение 2 мин, фильтруют через мембранный фильтр 45 мкм. Первые порции фильтрата, около 10 мл водного извлечения отбрасывают, двоводят объем раствора до метки и перемешивают.

Раствор стандартного образца. В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают около 10 мг (точная навеска) стандартного образца цианокобаламина, растворяют в очищенной воде, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. 1 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 10 мл и доводят объем раствора водой до метки и перемешивают (концентрация полученного раствора - 1 мкг/мл).

Условия хроматографирования

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

***Пригодность хроматографической системы:***

- относительное стандартное отклонение стандартного раствора не должно превышать 3,0 % (6 определений);

- разрешение *(R)* между пиками должно быть не менее 1;

- фактор ассиметрии *(As)* пиков должен быть не более 3;

- точность системы (*SR*) должна быть не более 3 % (6 определений).

Проводят определение раствора стандартного образца и испытуемого раствора и вычисляют содержание цианокобаламина в одной таблетке в мг (Х) по формуле:

где: S1 – площадь пика цианокобаламина на хроматограмме испытуемого раствора;

So – площадь пика цианокобаламина на хроматограмме раствора стандартного образца;

а1 – навеска порошка таблеток для приготовления испытуемого раствора, мг;

аo – навеска порошка таблеток для приготовления раствора стандартного образца, мг;

G – средняя масса таблеток, мг.

***Фолиевая кислота***

Метод ВЭЖХ (ОФС «Высоэффективная жидкостная хроматография высокого давления»).

Раствор А. (гидроксид тетрабутиламмония в метаноле раствор 25 %). В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 25 г гидроксид тетрабутиламмония, растворяют в метаноле, доводят объем раствора до метки тем же растворителем и перемешивают.

Раствор Б. В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 5 г диэтилентриаминпентауксусной кислоты, растворяют в 1М растворе натрия гидроксида, доводят объем раствора до метки тем же растворителем и перемешивают.

*Подвижная* фаза. В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 2 г калия гидрофосфата, прибавляют 650 мл воды, перемешивают до полного растворения навески, прибавляют 12 мл раствора А, 7 мл 3Н раствора фосфорной кислоты и 240 мл метанола. Полученный раствор охлаждают до температуры 20°С, доводят рН до 7,0 концентрированной фосфорной кислотой (85%) или аммония гидроксидом (раствор аммиака концентрированный 25 -28 %), доводят объем раствора водой до метки и фильтруют через мембранный фильтр 45 мкм.

\*Содержание воды и метанола можно варьировать (1 – 3 %), добавляя воду или метанол к приготовленной подвижной фазе или увеличивая рН до 7,15 для получения более четкого разделения на исходящей линии фолиевой кислоты и внутреннего стандарта.

*Испытуемый раствор.* Навеску порошка, измельченных таблеток, эквивалентную по содержанию 0,4 мг (точная навеска) фолиевой кислоты, помещают в центрифужную пробирку из янтарного стекла вместимостью 50 мл, прибавляют 25 мл раствора внутреннего стандарта, закрывают пробирку пробкой, встряхивают в течение 10 мин и центрифугируют при 3000 об/мин в течение 10 мин. Надосадочную жидкость используют в качестве испытуемого раствора.

*Раствор внутреннего стандарта.* В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают около 40 мг (точная навеска) метилпарагидроксибензоата, прибавляют 220 мл метанола и перемешивают. В отдельной колбе растворяют 2,0 г калия гидрофосфата в 300 мл воды и отдельными порциями, перемешивая, переносят в мерную колбу, содержащую метилпарагидроксибензоата. Содержимое колбы перемешивают и прибавляют еще 300 мл воды, 19 мл раствора А, 7 мл ЗН раствора фосфорной кислоты и 30 мл раствора Б. Доводят pH раствора до 9,8 раствором аммиака (9,5%-10,5%) и пропускают через раствор азот в течение 30 мин, затем доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

*Раствор стандартного образца.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают около 20 мг (точная навеска) стандартного образца фолиевой кислоты, растворяют в растворе внутреннего стандарта, доводят тем же растворителем до метки и перемешивают. 2 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора, раствором внутреннего стандарта до метки и перемешивают.

Условия хроматографирования

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 3,9 х 300 мм октадецилсилан, химически связанный с пористым силикагелем или керамическими микрочастицами, 5 мкм |
| Температура колонки | 20 °С |
| Детектор | спектрофотометрический, 280 нм |
| Скорость потока | 1,0 мл/мин |
| Объем пробы | 15 мкл |

***Пригодность хроматографической системы***

- относительное стандартное отклонение стандартного раствора не должно превышать 3,0 % (6 определений);

- разрешение *(R)* между пиками должно быть не менее 1;

- фактор ассиметрии *(As)* пиков должен быть не более 3;

- точность системы (*SR*) должна быть не более 3 % (6 определений).

Проводят определение раствора стандартного образца и испытуемого раствора и вычисляют содержание фолиевой кислоты в одной таблетке в мг (Х) по формуле:

где: S1 – площадь пика фолиевой кислоты на хроматограмме испытуемого раствора;

So – площадь пика фолиевой кислоты на хроматограмме раствора стандартного образца;

а1 – навеска порошка таблеток для приготовления испытуемого раствора, мг;

аo – навеска порошка таблеток для приготовления раствора стандартного образца, мг;

G – средняя масса таблеток, мг.

***Биотин***

Метод ВЭЖХ (ОФС «Высоэффективная жидкостная хроматография высокого давления»).

*Подвижная фаза.* В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 85 мл ацетонитрила, 1 г натрия перхлората и 1 мл концентрированной фосфорной кислоты (85%), разбавляют водой до метки и перемешивают. Полученную смесь фильтруют и дегазируют.

*Испытуемый раствор.* В мерную колбу вместимостью 200 мл помещают навеску порошка (точная навеска), эквивалентную по содержанию 1 мг биотина, прибавляют 3 мл диметилсульфоксида и встряхивают для увлажнения содержимого. Колбу помещают на водяную баню при температуре (60-70°С) на 5 мин, затем обрабатывают ультразвуком в течение 5 мин, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Смесь тщательно перемешивают и фильтруют через мембранный фильтр 0,45 мкм, отбрасывая первые 5 мл фильтрата.

*Раствор* с*тандартного образца.* В мерную колбу вместимостью 200 мл помещают около 67 мг (точная навеска) стандартного образца биотина, растворяют в диметилсульфоксиде, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают. 3 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 200 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Условия хроматографирования

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 4,6 х 150 мм октадецилсилан, химически связанный с пористым силикагелем или керамическими микрочастицами, 3 мкм |
| Температура колонки | 20 °С |
| Детектор | спектрофотометрический, 200 нм |
| Скорость потока | 1,2 мл/мин |
| Объем пробы | 100 мкл |

***Пригодность хроматографической системы***

- относительное стандартное отклонение стандартного раствора не должно превышать 3,0 % (6 определений);

- разрешение *(R)* между пиками должно быть не менее 1;

- фактор ассиметрии *(As)* пиков должен быть не более 3;

- точность системы (*SR*) должна быть не более 3 % (6 определений).

Количество биотина в одной таблетки в мг (Х) вычисляют по формуле:

где: S1 – площадь пика биотина на хроматограмме испытуемого раствора;

So – площадь пика биотина на хроматограмме раствора стандартного образца;

а1 – навеска порошка таблеток для приготовления испытуемого раствора, мг;

аo – навеска порошка таблеток для приготовления раствора стандартного образца, мг;

G – средняя масса таблеток, мг.

***Кальция пантотенат***

Метод ВЭЖХ (ОФС «Высоэффективная жидкостная хроматография высокого давления»).

*Подвижная фаза*. Смесь воды и концентрированной фосфорной кислоты (85 %) в соотношении 1000:1 (об/об).

*Испытуемый раствор*. Навеску порошка, содержащую около 15 мг кальция пантотената, помещают в подходящую центрифужную пробирку, прибавляют 25 мл раствора внутреннего стандарта, встряхивают в течение 10 мин и центрифугируют до получения прозрачной надосадочной жидкости. Далее надосадочную жидкость фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм, отбрасывая первые порции фильтрата.

*Раствор внутреннего стандарта.* В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают около 80,0 мг (точная навеска) стандартного образца п-гидроксибензойной кислоты, прибавляют 3 мл этилового спирта (95%) и встряхивают до растворения. К полученному раствору добавляют 50 мл воды, 7,1 г натрия дигидрофосфата, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Устанавливают pH раствора до 6,7 с помощью концентрированной фосфорной кислоты и вновь перемешивают.

*Раствор* с*тандартного образца.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают около 60,0 мг (точная навеска) стандартного образца кальция пантотената, растворяют в растворе внутреннего стандарта, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают. Полученный раствор имеет концентрацию 0,6 мг/мл.

Условия хроматографирования

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 3,9 х 150 мм октадецилсилан, химически связанный с пористым силикагелем или керамическими микрочастицами, 5 мкм |
| Температура колонки | 20 °С |
| Детектор | спектрофотометрический, 210 нм |
| Скорость потока | 1,5 мл/мин |
| Объем пробы | 10 мкл |

Относительное время удерживания: кальция пантотенат – 0,5

п-гидроксибензойная кислота – 1,0

***Пригодность хроматографической системы***

- относительное стандартное отклонение стандартного раствора не должно превышать 3,0 % (6 определений);

- разрешение *(R)* между пиками должно быть не менее 1;

- фактор ассиметрии *(As)* пиков должен быть не более 3;

- точность системы (*SR*) должна быть не более 3 % (6 определений).

Содержание кальция пантотената в одной таблетки в мг (Х) вычисляют по формуле:

Х =

где: S1 – площадь пика кальция пантотената на хроматограмме испытуемого раствора;

So – площадь пика кальция пантотената на хроматограмме раствора стандартного образца;

а1 – навеска порошка таблеток для приготовления испытуемого раствора, мг;

аo – навеска порошка таблеток для приготовления раствора стандартного образца, мг;

G – средняя масса таблеток, мг.

*Количественное определение минералов*

***Кальций, магний, железо, медь, цинк, марганец, селен, хром.***

Определение проводят методом атомно-абсорбционной спектрометрии

в соответствии ОФС «Атомно-абсорбционная спектроскопия».

***Кальций***

*Раствор лантана хлорида.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 26,7 г лантана хлорида гептагидрата, растворяют в 0,125 М растворе хлористоводородной кислоты, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают.

*Раствор сравнения*. (0,125 М раствор хлористоводородной кислоты, содержащий лантана хлорида раствор 0,1%). В мерную колбу вместимостью 100 помещают навеску 0,1 г лантана хлорида, растворяют в 0,125 М растворе хлористоводородной кислоты, доводят объем раствора этим же растворителем до метки и перемешивают.

*Испытуемый раствор.* Точное количество порошка эквивалентное массе 5 таблеток помещают в фарфоровый тигель и прокаливают в муфельной печи при температуре около 550°С в течение 8 ч и охлаждают. К содержимому с соблюдением мер предосторожности добавляют 60 мл хлористоводородной кислоты и кипятят на плитке в течение 30 мин, периодически смывая внутреннюю поверхность тигля 6 М раствором хлористоводородной кислоты. Содержимое тигля охлаждают и переносят количественно в мерную колбу вместимостью 100 мл. Стенки тигля промывают небольшими порциями 6 М раствором хлористоводородной кислоты и переносят в ту же мерную колбу, доводят объем раствора водой до метки, перемешивают и фильтруют через мембранный фильтр 0,45 мкм, отбрасывая первые 5 мл фильтрата.

В мерную колбу вместимостью 200 мл, переносят 5 мл полученного раствора доводят объем раствора 0,125 М раствором кислоты хлористоводородной до метки и перемешивают. Затем в мерную колбу вместимостью 200 мл переносят 3 мл полученного раствора, добавляют 2 мл раствора лантана хлорида, доводят объем раствора 0,125 М раствором кислоты хлористоводородной до метки и перемешивают. Конечная концентрация испытуемого раствора - около 2 мкг/мл.

*Раствор стандартного образца.* Около 1,001 г кальция карбоната высушивают при температуре 300 °С в течение 3 ч, охлаждают в эксикаторе в течение 2 ч и растворяют в мерной колбе вместимостью 1000 мл в 25 мл 1М раствора хлористоводородной кислоты. Раствор кипятят для удаления двуокиси углерода, доводят водой до метки и перемешивают. Полученный раствор содержит около 400 мкг кальция в 1 мл.

*Стандартный раствор.* В мерную колбу вместимостью 20 мл переносят 5 мл раствора стандартного образца кальция, доводят объем раствора 1М раствором хлористоводородной кислоты до метки и перемешивают. Полученный раствор содержит 100 мкг кальция в 1 мл.

*Калибровочный график*

В мерные колбы вместимостью 100 мл вносят соответственно: 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 и 3,0 мл стандартного раствора кальция, прибавляют 1 мл раствора лантана хлорида, доводят объем содержимого колб 0,125 М раствором хлористоводородной кислоты до метки и перемешивают. В результате получают калибровочные растворы с концентрацией 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 и 3,0 мкг кальция в 1мл.

Последовательно определяют поглощение калибровочных и испытуемого растворов на эмиссионной длине волны кальция 422,7 нм с помощью атомно-­абсорбционного спектрометра, оборудованного кальциевой лампой и закисноазотно-ацетиленовой горелкой.

В качестве раствора сравнения используют 0,125 М раствор хлористоводородной кислоты, содержащий лантана хлорида раствор 0,1%. На основании полученных результатов строят калибровочный график. По калибровочному графику определяют концентрацию испытуемого раствора в мкг/мл.

Cодержание кальция (Х) в мг в одной таблетке вычисляют по формуле:

Х =

где: C – концентрация кальция в испытуемом растворе, найденная по калибровочному графику, мкг/мл;

а1 - навеска порошка таблеток для приготовления испытуемого раствора, мг;

G – средняя масса таблеток, мг;

0,001 - содержание лантана хлорида в растворе сравнения, г.

***Железо***

*Испытуемый раствор.* Точное количество порошка таблеток эквивалентное около 100 мг железа переносят в фарфоровый тигель. Далее готовят раствор как описано в разделе «Кальций», без добавления раствора лантана хлорида. Раствор, полученный после фильтрования, используют в качестве испытуемого. Раствор лантана хлорида не добавляют.

1 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 200 мл, доводят объем раствора 0,125 М раствором кислоты хлористоводородной до метки и перемешивают. Полученный раствор имеет концентрацию около 5 мкг/мл.

*Раствор стандартного образца.* В мерную колбу вместимостью 1000 мл, помещают около 100 мг (точная навеска) порошка железа, растворяют в 25 мл 6М раствора хлористоводородной кислоты, доводят водой объем раствора до метки и перемешивают.

*Калибровочный график*

В мерные колбы вместимостью 100 мл переносят соответственно: 2,0; 4,0; 5,0; 6,0; 8,0 мл раствор стандартного образца железа, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. В результате получают калибровочные растворы с концентрацией 2,0; 4,0; 5,0; 6,0 и 8,0 мкг железа в 1 мл.

Последовательно определяют поглощение калибровочных и испытуемого растворов на эмиссионной длине волны железа 248,3 нм с помощью атомно-­абсорбционного спектрометра, оборудованного лампой с полым железным электродом и воздушно-ацетиленовой горелкой.

В качестве раствора сравнения используют 0,125 М раствор хлористоводородной кислоты. По калибровочному графику определяют концентрацию испытуемого раствора в мкг/мл.

Cодержание железа в мг (X) в одной таблетке вычисляют по формуле:

=

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

С - концентрация железа в испытуемом растворе, определенная с помощью калибровочного графика, мкг/мл.

G - средняя масса таблеток, мг.

***Цинк***

*Испытуемый раствор.* Точное количество порошка эквивалентное 50 мг цинка переносят в фарфоровый тигель. Далее готовят раствор как описано в разделе «Кальций» без добавления раствора лантана хлорида.

2 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят объем раствора 0,125 М раствором кислоты хлористоводородной до метки и перемешивают. Конечная концентрация испытуемого раствора - около 2 мкг/мл.

*Раствор стандартного образца.* В мерную колбу вместимостью 250 мл помещают около 311,0 мг (точная навеска) цинка, прибавляют 80 мл 5 М раствора хлористоводородной кислоты и, при необходимости, нагревают до растворения. Затем раствор охлаждают, доводят водой до метки и перемешивают. Раствор содержит около 1000 мкг цинка в 1 мл.

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

*Калибровочный график*

В мерные колбы вместимостью 100 мл переносят соответственно:1,0; 2,0; 3,0; 4,5; 5,0; 8,0 мл раствора стандартного образца цинка, доводят объем раствора 0,125 М раствором хлористоводородной кислоты до метки и перемешивают. В результате получают калибровочные растворы с концентрацией 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 и 2,5 мкг цинка в 1 мл.

Последовательно определяют поглощение калибровочных и испытуемого растворов на эмиссионной длине волны цинка 213,8 нм с помощью атомно­-абсорбционного спектрометра, оборудованного цинковой лампой с полым катодом и воздушно-ацетиленовой горелкой. В качестве раствора сравнения используют 0,125М раствор хлористоводородной кислоты. На основании полученных результатов строят калибровочный график. На основании полученных результатов строят калибровочный график. По калибровочному графику определяют концентрацию испытуемого раствора в мкг/мл.

Содержание цинка в мг (X) в одной таблетке вычисляют по формуле:

где: С - концентрация цинка в испытуемом растворе, определенная с помощью калибровочного графика, мкг/мл;

G — средняя масса таблеток, мг;

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

***Магний***

*Раствор лантана хлорида.* Раствор готовят как указано в разделе «Кальций».

*Испытуемый раствор*. Точное количество порошка эквивалентное массе 5 таблеток переносят в фарфоровый тигель. Далее готовят раствор, как описано в разделе «Кальций». 2 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора 0,125 М раствором кислоты хлористоводородной до метки и перемешивают. 1 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, добавляют 1 мл раствора лантана хлорида, доводят объем раствора 0,125 М раствором кислоты хлористоводородной до метки и перемешивают (концентрация раствора около 0,4 мкг/мл).

*Раствор стандартного образца*. В мерную колбу вместимостью 1000 мл, помещают около 1000 мг (точная навеска) ленты металлического магния, растворяют в 50 мл 6 М раствора хлористоводородной кислоты, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Полученный раствор содержит около 1000 мкг магния в 1 мл.

*Стандартный раствор.* В мерную колбу вместимостью 100 млпереносят 2 мл раствора стандартного образца магния, доводят объем раствора 0,125 М раствором хлористоводородной кислоты до метки и перемешивают. Полученный раствор содержит 50 мкг магния в 1 мл.

*Калибровочный график*

В мерные колбы вместимостью 100 мл переносят соответственно: 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 и 3,0 мл стандартного раствора магния, прибавляют 1 мл раствора лантана хлорида, доводят объем содержимого колб 0,125 М раствором хлористоводородной кислоты до метки и перемешивают. В результате получают калибровочные растворы с концентрацией 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 и 0,6 мкг магния в 1мл.

Последовательно определяют поглощение калибровочных и испытуемого растворов на эмиссионной длине волны кальция 285,2 нм с помощью атомно-­абсорбционного спектрометра, оборудованного лампой с полым катодом м воздушно-ацетиленовой горелкой.

В качестве раствора сравнения используют 0,125 М раствор хлористоводородной кислоты, содержащий лантана хлорида раствор 0,1%. На основании полученных результатов строят калибровочный график. По калибровочному графику определяют концентрацию испытуемого раствора в мкг/мл.

Содержание магния в мг (X) в одной таблетке вычисляют по следующей формуле:

,

где:G - средняя масса таблеток, мг;

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

С - концентрация магния в испытуемом растворе, найденная по калибровочному графику, мкг/мл.

***Медь***

*Испытуемый раствор*: Точное количество порошка эквивалентное массе 5 таблеток переносят в фарфоровый тигель. Далее готовят раствор, как описано в разделе «Кальций» без добавления раствора лантана хлорида. 4 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора 0,125 М раствором хлористоводородной кислоты до метки и перемешивают. Полученный раствор имеет концентрацию около 2,0 мкг/мл.

*Раствор стандартного образца.* В мерную колбу вместимостью 1000 мл вносят около 1 г медной фольги, растворяют в небольшом объеме азотной кислоты растворе 50 %, доводят объем раствора до метки азотной кислотой раствором 1 % и осторожно перемешивают. Полученный раствор содержит около 1000 мкг меди в 1 мл.

*Стандартный раствор*. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 10 мл раствора стандартного образца меди, доводят объем раствора 0,125 М раствором хлористоводородной кислоты до метки и перемешивают. Раствор содержит около 100 мкг меди в 1 мл.

*Калибровочный график*

В мерные колбы вместимостью 100 мл переносят соответственно:1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 мл раствора стандартного образца меди, доводят объем растворов водой до метки и перемешивают. В результате получают калибровочные растворы с концентрацией 0,5; 1,0; 2,0; 3,0 и 4,0 мкг меди в 1мл.

Последовательно определяют поглощение калибровочных и испытуемого растворов на эмиссионной длине волны меди 324,7 нм с помощью атомно­абсорбционного спектрометра, оборудованного лампой с медным катодом и воздушно-ацетиленовой горелкой.

В качестве раствора сравнения используют 0,125 М раствор хлористоводородной кислоты.

На основании полученных результатов строят калибровочный график. Содержание меди в мг (Х) в одной таблетке вычисляют по формуле:

Х =

где: C – концентрация меди в испытуемом растворе, найденная по калибровочному графику, мкг/мл;

а1 - навеска порошка таблеток для приготовления испытуемого раствора, мг;

G – средняя масса таблеток, мг.

***Марганец***

*Испытуемый раствор.* Точное количество порошка, эквивалентное массе 5 таблеток, помещают в фарфоровый тигель и далее готовят раствор как описано в разделе «Кальций», без добавления раствора лантана хлорида.

2 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора 0,125 М раствором хлористоводородной кислоты до метки и перемешивают. Концентрация полученного раствора около 1,0 мкг/мл.

*Раствор стандартного образца.* В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают около 1,0 г (точная навеска) марганца, растворяют в 20 мл азотной кислоты (65%), доводят объем раствора 6 М раствором хлористоводородной кислоты и перемешивают. Концентрация полученного раствора - около 1000 мкг марганца в 1 мл.

*Стандартный раствор.* 10 мл раствора стандартного образца марганца переносят в мерную колбу вместимостью 200 мл, доводят объем раствора 0,125 М раствором хлористоводородной кислоты до метки и перемешивают (концентрация марганца 50 мкг/мл).

*Калибровочный график*

В мерные колбы вместимостью 100 мл вносят соответственно: 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 и 3,0 мл стандартного раствора марганца, доводят объем раствора 0,125 М раствором хлористоводородной кислоты до метки и перемешивают. В результате получают калибровочные растворы с концентрацией 0,5; 0,75; 1,0; 1,5 и 2,0 мкг марганца в 1 мл.

Последовательно определяют поглощение калибровочных и испытуемого растворов на эмиссионной длине волны марганца 279,5 нм с помощью атомно-абсорбционного спектрометра, оборудованного марганцевой лампой с полым катодом и воздушно-ацетиленовой горелкой.

В качестве раствора сравнения используют 0,125 М раствор хлористоводородной кислоты.

На основании полученных результатов строят калибровочный график. По калибровочному графику определяют концентрацию испытуемого раствора в мкг/мл.

Содержание марганца в мг (Х) в одной таблетке вычисляют по формуле:

,

где: С – концентрация марганца в испытуемом растворе найденная по калибровочному графику, мкг/мл;

а1- навеска порошка таблеток для приготовления испытуемого раствора, мг;

G – средняя масса таблеток, мг.

***Хром***

*Испытуемый раствор.* Точное количество порошка, эквивалентное массе 5 таблеток, помещают в фарфоровый тигель и далее готовят раствор как описано в разделе «Кальций», без добавления раствора лантана хлорида. Раствор, полученный после фильтрования через мембранный фильтр (0,45 мкм), используют в качестве испытуемого (концентрация раствора около 1 мкг/мл).

*Раствор стандартного образца*. В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают около 2,829 г (точная навеска) калия дихромата, предварительно высушенного при температуре 120°С в течение 4 ч, растворяют в воде, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Полученный раствор содержит около 1000 мкг хрома в 1 мл (раствор должен храниться в полиэтиленовом контейнере).

*Стандартный раствор.* 10 мл раствора стандартного образца хрома переносят в мерную колбу вместимостью 1000 мл, прибавляют 50 мл 6 М раствора хлористоводородной кислоты, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Полученный раствор содержит около 10 мкг хрома в 1 мл.

*Калибровочный график*

В мерные колбы вместимостью 100 мл вносят соответственно: 10; 20; 15; 20 мл стандартного раствора хрома, доводят объем растворов 0,125 М раствором хлористоводородной кислоты до метки и перемешивают. В результате получают калибровочные растворы с концентрацией 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 мкг хрома в 1 мл.

Последовательно определяют поглощение стандартных растворов на эмиссионной длине волны хрома 357,9 нм с помощью атомно-абсорбционного спектрометра, оборудованного лампой с полым хромовым катодом и воздушно­ ацетиленовой горелкой. В качестве раствора сравнения используют 0,125 М раствор хлористоводородной кислоты.

На основании полученных результатов строят калибровочный график. По калибровочному графику определяют концентрацию испытуемого раствора в мкг/мл.

Содержание хрома в мкг (Х) в одной таблетке вычисляют по формуле:

Х =

где: С – Концентрация хрома в испытуемом растворе, найденная по калибровочному графику, мкг/мл;

а1 – навеска порошка таблеток для приготовления испытуемого раствора, мг;

G – средняя масса таблеток, мг.

***Селен***

*Раствор для разведения.* 20 г аммония хлорида растворяют в 1000 мл воды и перемешивают.

*Испытуемый раствор*. В подходящую термостойкую колбу помещают количество порошка, эквивалентное по содержанию 1000 мкг селена, прибавляют 12 мл концентрированной азотной кислоты и встряхивают колбу до получения однородной дисперсии и обрабатывают ультразвуком в течение 10 мин. Далее раствор кипятят в течение 15 мин, охлаждают до температуры 15-25°С, прибавляют 8 мл хлорной кислоты и нагревают до появления паров хлорной кислоты, вращают колбу до прекращения выделения паров. Продолжают проведение циклов «нагревания и вращения» до полного прекращения выделения паров хлорной кислоты. Раствор охлаждают до температуры 15-25°С, количественно переносят содержимое в мерную колбу вместимостью 50 мл с помощью раствора для разведения, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают. Концентрация полученного раствора около 20 мкг/мл.

\*Приготовление испытуемого раствора следует проводить в вытяжном шкафу, соблюдая технику безопасности при нагревании с сильными кислотами.

*Раствор стандартного образца.* Около 1 г металлического селена (точная навеска) растворяют в минимально возможном объеме концентрированной азотной кислоты, выпаривают раствор досуха, прибавляют 2 мл воды, перемешивают и снова выпаривают досуха. Растворение в воде и выпаривание повторяют еще 3 раза. Далее сухой остаток растворяют в 3 М растворе хлористоводородной кислоты, количественно переносят с помощь этого же растворителя в мерную колбу вместимостью 1000 мл, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают. Полученный раствор содержит около 1000 мкг селена в 1 мл.

*Стандартный раствор.* В мерную колбу вместимостью 100 мл переносят 10 мл раствора стандартного образца селена, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Полученный раствор содержит около 100 мкг селена в 1 мл.

*Калибровочный график*

В мерные колбы вместимостью 100 мл вносят соответственно: 5,0; 10,0; 25,0 мл стандартного раствора селена, добавляют 5,0 мл хлорной кислоты, нагревают в течение 15 мин, охлаждают до температуры 15-25°С, доводят объем растворов раствором для разведения до метки и перемешивают. В результате получают калибровочные растворы с концентрацией 5,0; 10,0; 25,0 мкг селена в 1 мл.

Последовательно определяют поглощение калибровочных растворов на эмиссионной длине волны селена 196 нм с помощью атомно-абсорбционного спектрометра, оборудованного селеновой лампой с полым катодом и воздушно ­ацетиленовой горелкой. В качестве раствора сравнения используют смесь раствора для разведения и хлорной кислоты в соотношении 20:1.

На основании полученных результатов строят калибровочный график. По калибровочному графику определяют концентрацию испытуемого раствора (мкг/мл).

Содержание селена (Х) в мкг в навеске испытуемого образца вычисляют по формуле:

Х = ,

где: С - концентрация селена в испытуемом растворе, найденная по калибровочному графику, мкг/мл;

G - средняя масса таблеток, мг;

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

***Фосфор***

*Метод спектрофотометрии***.** Определение проводят в соответствии сОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях».

*Раствор молибдата аммония*. 12,5 г аммония молибдата растворяют в 150 мл воды, прибавляют 100 мл раствора серной кислоты и перемешивают.

*Раствор гидрохинона*. 0,5 г гидрохинона растворяют в 100 мл воды и прибавляют 1 каплю серной кислоты (93-95%) и перемешивают.

*Испытуемый раствор.* Количество порошка, эквивалентное по содержанию 100 мг фосфора (точная навеска), помещают в термостойкую колбу, прибавляют 25 мл азотной кислоты (65%) и нагревают на горячей плитке в течение 30 мин. Прибавляют 15 мл концентрированной хлористоводородной кислоты и продолжают нагревание до прекращения выделения коричневых паров. Раствор охлаждают до температуры 15-25 °С и переносят количественно, с помощью небольших порций воды в мерную колбу вместимостью 500 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. В мерную колбу вместимостью 100 мл переносят 10 мл полученного раствора, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

*Раствор стандартного образца фосфора.* В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 4,395 г (точная навеска), калия дигидрофосфата, предварительно высушенного при температуре 105°С в течение 2-х ч и охлажденного в эксикаторе, растворяют в воде, прибавляют 6 мл серной кислоты (93-95%), доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Концентрация полученного раствора около 1000 мкг фосфора в 1 мл.

*Стандартный раствор*. В мерную колбу вместимостью 100 мл вносят 2 мл раствора стандартного образца фосфора, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

В мерные колбы вместимостью 25 мл помещают по 5 мл стандартного, испытуемого растворов и воду (раствор контрольный), в каждую колбу прибавляют по 1 мл раствора аммония молибдата, 1 мл раствора гидрохинона и 1 мл раствора натрия бисульфита, перемешивают, доводят объем растворов водой в каждой колбе до метки, перемешивают и оставляют на 30 мин.

Определяют оптическую плотность стандартного, испытуемого растворов в УФ-свете в 1см кюветах при максимуме поглощения около 650 нм против контрольного раствора.

Количество фосфора в мг в навеске испытуемого образца определяют по формуле:

Х =

где: А1 – оптическая плотность испытуемого раствора;

Ао – оптическая плотность стандартного раствора;

а1 – навеска порошка таблеток для приготовления испытуемого раствора, мг;

ао – навеска калия гидрофосфата для приготовления стандартного раствора, мг;

G - средняя масса таблеток, мг;

0,228 - коэффициент пересчета калия гидрофосфата на фосфор.

***Йод***

Метод титриметрический.

*Бромная вода (насыщенный водный раствор брома).* 20 мл брома помещают в колбу с притертой пробкой, добавляют 100 мл воды. Колбу закрывают пробкой и встряхивают. Отстаивают в течение 30 мин и используют верхний слой.

*Испытуемый раствор.* Количество порошка около 34,8 г, (точная навеска), содержащее около 3 мг йода помещают в никелевый тигель, прибавляют 5 г натрия карбоната, 5 мл натрия гидроксида раствора 50 % и 10 мл этилового спирта (спирт этиловый ректификованный), стараясь, чтобы вся смесь была увлажнена. Нагревают тигель на паровой бане до испарения спирта и сушат в течение 30 мин, при температуре 100°С. Далее тигель помещают в муфельную печь при температуре 500°С на 15 мин, затем охлаждают, прибавляют 25 мл воды, накрывают крышкой и кипятят в течение 10 мин. Раствор фильтруют через мембранный фильтр (45 мкм), количественно переносят с помощью небольших порций кипящей воды в коническую колбу, прибавляют концентрированную фосфорную кислоту (85%) до тех пор пока раствор не станет нейтральным по метиловому оранжевому и прибавляют еще 1 мл концентрированной фосфорной кислоты. Прибавляют бромную воду и кипятят раствор до обесцвечивания еще 5 мин. Затем прибавляют несколько кристалликов салициловой кислоты и охлаждают раствор до температуры (18- 20°С), прибавляют 1 мл фосфорной кислоты (85%), около 0,5 г калия йодида и титруют выделившийся йод 0,005 N раствором натрия тиосульфата, прибавляя раствор крахмала после исчезновения окраски йода.

Содержание йода в мкг в навеске испытуемого образца рассчитывают по следующей формуле:

Х =

где: V- объем натрия тиосульфата, пошедшее на титроавние, мл;

N – нормальная концентрация натрия тиосульфата;

*G-*средняя масса таблеток;

a1 – навеска порошка таблеток для приготовления испытуемого раствора;

105,8 – количество йода эквивалентное 1 мл 0,005 Н раствора натрия тиосульфата.

**Хранение.** При температуре от 10 до 30 °С в соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственных средств».