**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |  |
| --- | --- |
| **Аскорбиновая кислота + Декспантенол (D-пантенол) + Колекальциферол + Никотинамид + Пиридоксина гидрохлорид + Ретинола пальмитат + Рибофлавин фосфат натрия + Тиамина гидрохлорид + Цианокобаламин, сироп**  ***Acidum ascorbicum + Dexpathenolum + Colecalciferolum + Nicotinamidum + Pyridocxini hydrochloridum + Retinoli palmitas+ Riboflavini natrii phosphas + Thiamini hydrochloridum + Cyanocobalaminum, sirupus*** | **ФС**  **Вводится впервые** |

Настоящая фармакопейная статья распространяется на лекарственный препарат Аскорбиновая кислота + Декспантенол (D-пантенол) + Колекальциферол + Никотинамид + Пиридоксина гидрохлорид + Ретинола пальмитат + Рибофлавин фосфат натрия + Тиамина гидрохлорид + Цианокобаламин, сироп.

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

Препарат содержит от заявленного количества:

̶ аскорбиновая кислота C6H8O6 – не менее 90 % и не более 170 %;

̶ декспантенол (D-пантенол) С9Н19NO4 –не менее 90 % и не более 150 %;

̶ колекальциферол C27H44O –не менее 90 % и не более 165 %;

̶ никотинамид С6Н6N2O не менее 90 % и не более 150 %;

̶ пиридоксина гидрохлорид C8H11NO3·HCI не менее 90 % и не более 150 %;

̶ ретинола пальмитат С36Н60О2 –не менее 90 % и не более 165 %.

̶ рибофлавина фосфат натрия C17H20N4NaO9P–не менее 90 % и не более 150 %.

̶ тиамина гидрохлорид C12H17ClN4OS·HCl –не менее 90 % и не более 150 %.

̶ цианокобаламин C63H88CoN14O14P не менее 80 %

Описание. Содержание раздела приводится в соответствии с ОФС «Лекарственные формы», ОФС «Сиропы».

**Подлинность**

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

Время удерживания основных пиков на хроматограммах испытуемых растворов *ретинола пальмитата, тиамина гидрохлорида,* рибофлавина фосфат натрия, *пиридоксина гидрохлорида,* никотинамида, колекальциферола, декспантенола должно соответствовать времени удерживания пиков соответствующих компонентов на хроматограммах растворов стандартных образцов или стандартных растворов.

*Масс-спектрометрия с индуктивно связанной плазмой (ИСП-МС).*  Цианокобаламин. Определение проводят в соответствии с ОФС «Масс-спектрометрия» по разделу «Количественное определение». Масс-спектр стандартного раствора при массовом числе (AMU) 59 имеет отклик, соответствующий спектру испытуемого раствора.

*Тонкослойная хроматография. Аскорбиновая кислота.* Определение проводят в соответствии с ОФС «Тонкослойная хроматография».

*Хроматографические условия.*

*Пластинка: ТСХ*  пластинка со слоем целлюлозы F, толщина слоя 0,1 мм.

*Подвижная фаза (ПФ*). Вода⎯муравьиная кислота⎯ацетон⎯бутанол 20:20:30:30.

*Растворитель*. Щавелевой кислоты раствор 0,5 %.

Испытуемый раствор. В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 1,0 мл препарата, доводят объем раствора растворителем до метки и перемешивают.

*Раствор стандартного образца аскорбиновой кислоты.* Около 15 мг (точная навеска) стандартного образца аскорбиновой кислоты помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, растворяют в растворителе, доводят объем раствора растворителем до метки и перемешивают.

*Реактив для детектирования - Йодплатината* *реактив*. Калия йодида раствор 6 %⎯хлорплатиновой кислоты раствор 0,3 % 1:1.

На линию старта хроматографической пластинки наносят в виде полос размером 10 мм по 10 мкл испытуемого раствора и раствор стандартного образца аскорбиновой кислоты. Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе, помещают в подготовленную хроматографическую камеру с ПФ и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт подвижной фазы пройдет 75-80 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат на воздухе до удаления следов растворителей.

Сухую пластинку опрыскивают реактивом для *детектирования* - *Йодплатината* *реактив* и производят оценку при видимом свете.

*Пригодность хроматографической системы*

На хроматограмме раствора стандартного образца видно пятно аскорбиовой кислоты от белого до желтоватого цвета.

*Результ.* Основная зона адсорбции на хроматограмме испытуемого раствора по положению, величине и окраске должна соответствовать зоне адсорбции аскорбиновой кислоты на хроматограмме раствора стандартного образца.

**Плотность.** Испытание проводят в соответствии с требованиями ОФС «Плотность» метод 4. Нормы указывают в нормативной документации.

**pH.** От 3,0 до 4,0. В соответствии с требованиями ОФС «Ионометрия», метод 3.

**Извлекаемый объем.** Испытание проводят в соответствии с требованиями ОФС «Извлекаемый объем».

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

**Количественное определение**

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

*Подвижная фаза А*. Вода.

*Подвижная фаза В*. Метанол.

*Подвижная фаза А⎯ Подвижная фаза В 2:98.*

Перед использованием подвижную фазу фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм и дегазируют любым подходящим способом.

Испытуемый раствор. Точную навеску препарата, эквивалентную по содержанию 0,50 мг ретинола пальмитата, помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора метанолом до метки и обрабатывают ультразвуком в течение около 20 мин. Охлаждают суспензию до 15-25 °С, аликвоту суспензии центрифугируют при 3500 об/мин в течение около 10 мин. Центрифугат фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

Испытуемый раствор стабилен 2 ч при температуре 15-25 °С.

Основной раствор стандартного образца *ретинола пальмитата* Точную навеску стандартного образца ретинола пальмитата, соответствующую 18000 ME витамина А (около 10 мг), помещают в мерную колбу вместимостью 20 мл, прибавляют метанол до около 70-80 объема мерной колбы и обрабатывают ультразвуком в течение около 30 мин или до полного растворения стандарта (несколько раз перемешивают при обработке ультразвуком). Охлаждают раствор до температуры до 15-25 °С, доводят объем раствора метанолом до метки и перемешивают.

Раствор стандартного образца *ретинола пальмитата*. В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 1,0 мл основного раствора стандартного образца 1, доводят объем раствора метанолом до метки и перемешивают.

Раствор стандартного образца используют свежеприготовленным.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 125 х 4,0 мм силикагель октадецилсилильный для хроматографии, 5 мкм; |
| Температура колонки | 30 °С; |
| Температура образца: | 25 °С; |
| Детектор | спектрофотометрический:  280 нм; |
| Объем пробы | 20 мкл; |
| Скорость потока | 2,0 мл/мин; |

Время хроматографирования около 15 мин.

Время удерживания пика ретинола пальмитата около 7 мин.

*Проверка пригодности хроматографической системы*

На хроматограмме раствора стандартного образца ретинола пальмитата:

* *относительное стандартное отклонение* площадей пика ретинола пальмитата не более 2,0 %;
* *фактор асимметрии* (*As*) пика ретинола пальмитата не более 1,5;
* *эффективность хроматографической колонки* (N) рассчитанная по пику ретинола пальмитата не менее 1500 теоретических тарелок.

Содержание ретинола пальмитата C36H60O2 в препарате в процентах от заявленного количества (X) вычисляют по формуле:

Х=,

где: S1 - площадь пика ретинола пальмитата на хроматограмме испытуемого

раствора;

So - площадь пика ретинола пальмитата на хроматограммах раствора стандартного образца;

ао - навеска стандартного образца ретинола пальмитата, мг;

Р - содержание ретинола пальмитата в стандартном образце в мг/мг;

А - активность ретинола пальмитата в стандартном образце ретинола

пальмитата, МЕ/мг;

р - плотность препарата, г/мл;

а - навеска препарата, г;

L - заявленное количество ретинола пальмитата в препарате, МЕ/мл;

100 - пересчет в проценты.

**Тиамина гидрохлорид, рибофлавина фосфат натрия, пиридоксина гидрохлорид, никотинамид.** Определение проводят методом ВЭЖХ (ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография»).

*Растворитель* - уксусная кислота раствор 1 %.

*Подвижная фаза А.* В мерную колбу вместимостью 1000 мл, помещают 1,25 г натрия гексансульфоната, прибавляют 50 мл метанола, 10 мл уксусной кислоты ледяной и 2,0 мл триэтиламина, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

*Подвижная фаза В.* В мерную колбу вместимостью 1000 мл, помещают 1,25 г натрия гексансульфоната, прибавляют 160 мл метанола, 10 мл уксусной кислоты ледяной и 2,0 мл триэтиламина, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Перед использованием подвижную фазу А и В фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм и дегазируют любым подходящим способом.

Испытуемый раствор. Точную навеску препарата, эквивалентную по содержанию 2,0 мг тиамина гидрохлорида, 2,0 мг рибофлавина фосфат натрия, 1,2 мг пиридоксина гидрохлорида, 10,0 мг никотинамида, помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора растворителем до метки и обрабатывают ультразвуком в течение около 20 мин (несколько раз перемешивают при обработке ультразвуком). Охлаждают суспензию до температуры 15-25 °С, аликвоту суспензии центрифугируют при 3500 об/мин в течение около 10 мин. Центрифугат фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

Испытуемый раствор стабилен 6 ч при температуре 15-25 °С.

Раствор стандартного образца *тиамина гидрохлорида*. Около 20,0 мг (точная навеска) стандартного образца тиамина гидрохлорида помещают в мерную колбу вместимостью 20 мл, растворяют в растворителе, доводят объем раствора растворителем до метки и перемешивают.

Раствор стандартного образца *рибофлавина фосфата натрия.* Около 6,0 мг (точная навеска) стандартного образца рибофлавина фосфата натрия помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют около 70 мл растворителя и обрабатывают ультразвуком в течение около 15 мин (несколько раз перемешивают при обработке ультразвуком). Охлаждают раствор до температуры 15-25 °С, доводят объем раствора растворителем до метки, обрабатывают ультразвуком в течение около 15 мин или до полного растворения стандарта (несколько раз перемешивают при обработке ультразвуком).

Раствор стандартного образца *пиридоксина гидрохлорида*. Около 12,0 мг (точная навеска) стандартного образца пиридоксина гидрохлорида помещают в мерную колбу вместимостью 20 мл, растворяют в растворителе, доводят объем раствора растворителем до метки и перемешивают.

Стандартный раствор.Около 5,0 мг (точная навеска) стандартного образца никотинамида помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 1,0 мл раствора стандартного образца тиамина гидрохлорида, 15,0 мл раствора стандартного образца рибофлавина фосфата натрия и 1,0 мл раствора стандартного образца пиридоксина гидрохлорида, доводят объем раствора растворителем до метки и перемешивают.

Стандартный раствор стабилен 20 ч при температуре 15-25 °С.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 250 х 4,0 мм, силикагель октадецилсилильный для хроматографии, 5 мкм; |
| Температура колонки | 35 °С; |
| Температура образца | 25 °С; |
| Детектор | УФ, 270 нм; | |
| Объем пробы | 20 мкл; | |
| Скорость потока | 1,5 мл/мин. | |

Время хроматографирования около 20 мин.

Время удерживания соединений: никотинамида около 3 мин; пиридоксина около 7 мин; рибофлавина фосфата около 12 мин; тиамина около 14 мин.

Подвижная фаза: градиентное элюирование

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Время (t, мин) | подвижная фаза А (%) | подвижная фаза В (%) |
| 0 | 100 | 0 |
| 7 | 100 | 0 |
| 9 | 0 | 100 |
| 19 | 0 | 100 |
| 20 | 100 | 0 |
| 23 | 100 | 0 |

Хроматографируют стандартный раствор и испытуемый раствор.

*Проверка пригодности хроматографической системы*

На хроматограмме стандартного раствора:

*̶ относительное стандартное отклонение* площадей пиков тиамина не более 2,0 % (5 определений)

рибофлавина фосфата не более 2,0 %

пиридоксина не более 2,0 %

никотинамида не более 2,0 %;

* *эффективность хроматографической колонки* (N) рассчитанная по пику тиамина не менее 20000 теоретических тарелок

рибофлавина фосфат натрия не менее 15000 теоретических тарелок никотинамида не менее 3000 теоретических тарелок пиридоксина не менее 4000 теоретических тарелок;

̶ *фактор асимметрии* (*As)* пика тиамина не более 1,6, рибофлавина фосфат натрия не более 1,5, никотинамида не более 2,0, пиридоксина не более 1,6;

* *разрешение между пиком* пиридоксина и пиком рибофлавина фосфат натрия не менее 5;
* *разрешение между пиком* никотинамида и пиком пиридоксина не менее 10;
* *разрешение между пиком* рибофлавина фосфата и пиком тиамина не менее

10.

Содержание тиамина гидрохлорида C12H17ClN4OS·HCl в препарате в процентах от заявленного количества (X) вычисляют по формуле:

Х=

где: S1 - площадь пика тиамина гидрохлорид на хроматограмме испытуемого

раствора;

So - средняя площадь пика тиамина гидрохлорид на хроматограмме

раствора стандартного образца;

ао - навеска стандартного образца тиамина гидрохлорида, мг;

Р - содержание тиамина гидрохлорида в стандартном образце в пересчете на безводное вещество, мг/мг;

W - содержание воды, %;

L - заявленное количество вещества в препарате, мг/мл;

100 - пересчет в проценты.

Содержание рибофлавина фосфат натрия C17H20N4NaO9P в препарате в процентах от заявленного количества (X) вычисляют по формуле:

Х==,

где: S1 - площадь пика рибофлавина фосфат натрия на хроматограмме

испытуемого раствора;

So - средняя площадь пика рибофлавина фосфат натрия на

хроматограмме раствора стандартного образца;

ао - навеска стандартного образца рибофлавина фосфат натрия, мг;

Р - содержание рибофлавина в рибофлавине фосфат натрия в стандартном образце в пересчете на сухое вещество, %;

478,3- молекулярная масса рибофлавина фосфат натрия;

376,4- молекулярная масса рибофлавина;

L - заявленное количество вещества в препарате, мг/мл;

100 - пересчет в проценты.

Содержание пиридоксина гидрохлорида C8H11NO3·HCI в препарате в процентах от заявленного количества (X) вычисляют по формуле:

Х==

где: S1 - площадь пика пиридоксина гидрохлорида на хроматограмме

испытуемого раствора;

So - средняя площадь пика пиридоксина гидрохлорида на

хроматограмме раствора стандартного образца;

ао - навеска стандартного образца пиридоксина гидрохлорида, мг;

Р - содержание пиридоксина гидрохлорида в стандартном образце, мг/мг;

L - заявленное количество вещества в препарате, мг/мл;

100 - пересчет в проценты.

Содержание никотинамида С6Н6N2O в препарате в процентах от заявленного количества (X) вычисляют по формуле:

Х=

где: S1 - площадь пика никотинамида на хроматограмме испытуемого

раствора;

So - средняя площадь пика никотинамида на хроматограмме раствора

стандартного образца;

ао - навеска стандартного образца никотинамида, в мг;

Р - содержание никотинамида в стандартном образце, мг/мг;

р - плотность препарата, г/мл;

а - навеска препарата, г;

L - заявленное количество вещества в препарате, мг/мл;

100 - пересчет в проценты.

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

Испытание проводят в защищенном от света месте!

Подвижная фаза А. Вода.

Подвижная фаза В. Метанол.

Подвижная фаза А⎯ Подвижная фаза В 5:95.

Перед использованием подвижную фазу фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

Испытуемый раствор. Точную навеску препарата, эквивалентную по содержанию около 5,0 мкг колекальциферола помещают в соответствующую колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 10 мл диметилсульфоксида и 50 мл гексана. Взбалтывают и нагревают при постоянном взбалтывании при температуре 60 °С в течение около 45 мин. Охлаждают до 15-25 °С, взбалтывают на механическом шейкере в течение еще 15 мин и оставляют раствор на несколько мин.

Отбирают верхний слой гексана и пропускают через фильтр в колбу для ротационного испарителя вместимостью 250 мл. К остатку в колбе Эрленмейера (слой диметилсульфоксида) прибавляют 30 мл гексана и взбалтывают на механическом шейкере в течение около 15 мин, отбирают верхний слой гексана в колбу для ротационного испарителя. Экстрагирование повторяют еще 2 раза с 30 мл гексана.

В конце промывают фильтр для разделения фаз 10 мл гексана. Содержимое колбы выпаривают на ротационном испарителе при температуре 40 °С досуха. Сухой остаток растворяют в 2,0 мл метанола и фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. Фильтрат представляет собой испытуемый раствор. (Концентрация колекальциферола: около 100 МЕ/мл). Испытуемый раствор стабилен 5 сут. в автосамплере при температуре 15-25 °С.

Раствор стандартного образца колекальциферола. Точную навеску стандартного образца колекальциферола, соответствующую 500000 ME (около 12,5 мг) помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в метаноле, доводят объем раствора метанолом до метки.

В мерную колбу вместимостью 50 мл, помещают 1,0 мл полученного раствора, доводят объем раствора метанолом до метки и перемешивают

В колбу Эрленмейера вместимостью 100 мл, помещают 1,0 млраствора стандартного образца колекальциферола*,* 10 мл диметилсульфоксида и 50 мл гексана взбалтывают и нагревают при постоянном взбалтывании при температуре 60 °С в течение около 45 мин. Охлаждают раствора до 15-25 °С, взбалтывают на механическом шейкере в течение еще 15 мин и оставляют раствор на несколько минут.

Отбирают пипеткой верхний слой гексана и пропускают через фильтр в колбу для ротационного испарителя вместимостью 250 мл. К остатку в колбе Эрленмейера (слой диметилсульфоксида) прибавляют 30 мл гексана и взбалтывают на механическом шейкере в течение около 15 мин, отбирают пипеткой верхний слой гексана в колбу для ротационного испарителя. Экстрагирование повторяют еще 2 раза с 30 мл гексана.

В конце промывают фильтр около 10 мл гексана. Содержимое колбы выпаривают на ротационном испарителе при температуре 40 °С досуха. Сухой остаток растворяют в 2,0 мл метанола и фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. Фильтрат представляет собой раствор стандартного образца колекальциферола (концентрация колекальциферола около 100 МЕ/мл).

Раствор стандартного образца стабилен 5 сут. в автосамплере при температуре 15-25 °С.

*Хроматографические условия.*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка: | 200 х 2,1 мм, силикагель октадецилсилильный эндкепированный для хроматографии, 5 мкм; |
| Температура колонки: | 35 °С; |
| Температура образца | 25 °С; |
| Детектор: | УФ, 265 нм; |
| Объем пробы: | 80 мкл; |
| Скорость потока: | 0,6 мл/мин; |

Время хроматографирования: около 42 мин.

Время удерживания пика колекальциферола около 5 мин.

Программа градиентного элюирования:

*Проверка пригодности хроматографической системы*

На хроматограмме раствора стандартного образца колекальциферола:

* *относительное стандартное отклонение* площадей пика колекальциферола не более 2,0 % (5 определений);
* *фактор асимметрии* (As) пика колекальциферола не более 2,0;
* *эффективность хроматографической колонки* (N) рассчитанная по пику колекальциферола не менее 1000 теоретических тарелок.

Затем вводят испытуемый раствор, регистрируют хроматограммы.

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

Х=,

где: S1 - площадь пика колекальциферола на хроматограмме испытуемого

раствора;

So - средняя площадь пика колекальциферола на хроматограммах

раствора стандартного образца;

ао - навеска стандартного образца колекальциферола, мг;

Р - содержание колекальциферола в стандартном образце, %;

А - активность колекальциферола в стандартном образце, МЕ/мг;

р - плотность препарата, г/мл;

а - навеска препарата, г;

L - заявленное количество колекальциферола в препарате, МЕ/мл;

100 - пересчет в проценты.

***Декспантенол*** *(D-пантенол).* Определение проводят методом ВЭЖХ (ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография»).

*Натрия гексансульфонат раствор 4,3 мМ pH 2,8±*0,05. В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 0,8 г натрия гексансульфоната растворяют в триэтиламина растворе водном 0,1 %, доводят объем раствора этим же растворителем до метки и перемешивают, корректируют pH раствора до 2,8 ± 0,05 фосфорной кислотой концентрированной.

*Подвижная фаза А.* Метанол

*Подвижная фаза В*. Натрия гексансульфонат раствор 4,3 мМ, pH 2,8±0,05.

Подвижная фаза А - Подвижная фаза В (15:85).

Перед использованием подвижную фазу фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

*Растворитель.* Вода.

Испытуемый раствор. Точную навеску препарата, эквивалентную по содержанию 2,0 мг декспантенола, помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора растворителем (вода) до метки и обрабатывают ультразвуком в течение около 20 мин (несколько раз перемешивают при обработке ультразвуком). Охлаждают суспензию до 15-25 °С, аликвоту суспензии центрифугируют при 3500 об/мин в течение около 10 мин. Центрифугат фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. Испытуемый раствор используют свежеприготовленным.

Раствор стандартного образца декспаетенола. Около 50 мг (точная навеска) стандартного образца декспантенола помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют растворитель до около 75 % объема мерной колбы и обрабатывают ультразвуком в течение около 10 мин или до полного растворения стандарта (несколько раз перемешивают при обработке ультразвуком). Охлаждают раствор до 15-25 °С, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

В мерную колбу вместимостью 50 мл, помещают 1,0 мл раствора стандартного образца декспаетенола, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают

Раствор стандартного образца используют свежеприготовленным.

*Хроматографические условия.*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка: | 250 х 4,0 мм, силикагель октадецилсилильный эндкепированный для хроматографии, 5 мкм; |
| Температура колонки: | 30 °С; |
| Температура образца | 25 °С; |
| Детектор: | УФ, 210 нм; |
| Объем пробы: | 20 мкл; |
| Скорость потока: | 0,8 мл/мин. |

Время хроматографирования: около 65 мин.

Время удерживания пика Декспантенола около 6 мин.

В случае задержки выхода пиков время хроматографирования может быть пролонгировано. Время хроматографирования раствора стандартного образца может быть уменьшено на не менее трехкратную ширину основного пика на базовой линии.

*Проверка пригодности хроматографической системы*

На хроматограмме раствора стандартного образца декспантенола:

* *относительное стандартное отклонение* площадей пика декспантенола не более 2,0 % (5 определений);
* *фактор асимметрии* (As) пика декспантенола не более 1,5;
* *эффективность хроматографической колонки* (N) рассчитанная по пику декспантенола не менее 5000 теоретических тарелок.

Затем вводят испытуемый раствор, регистрируют хроматограммы.

Содержание декспантенола С9Н19NO4 в препарате в процентах от заявленного количества (X) вычисляют по формуле:

X=

где: S1 - площадь пика декспантенола на хроматограмме испытуемого

раствора;

So - средняя площадь пика декспантенола на хроматограммах раствора стандартного образца;

ао - навеска стандартного образца декспантенола, мг;

Р - содержание декспантенола в стандартном образце, в пересчете на безводное вещество, мг/мг;

W - содержание воды, %;

р - плотность препарата, г/мл;

а - навеска препарата, г;

L - заявленное количество декспантенола в препарате, мг/мл;

100 - пересчет в проценты.

***Цианокобаламин*** по *кобальту*. Метод Масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой, метод внешнего стандарта (ОФС «Масс-спектрометрия с индуктивно связанной плазмой»).

*Раствор для промывания -* азотной кислоты раствор 1 %.

*Раствор внутреннего стандарта* Bi, In, Li6, Sc, Tb, Y *(1000 мкг/л).* В пробирки вместимостью 50 мл помещают 500 мкл раствора внутреннего стандарта Bi, In, Li6, Sc, Tb, Y (100 мкг/мл), прибавляют 5,0 мл азотной кислоты концентрированной, доводят объем раствора водой для хроматографии до 50 мл и перемешивают.

Испытуемый раствор и контрольный раствор для испытуемого образца. Около 1,0 г (точная навеска) гомогенизированного образца препарата в двух повторностях помещают в реакционные сосуды и прибавляют 5,0 мл азотной кислоты концентрированной и 0,5 мл водорода пероксида. Для приготовления контрольного раствора для испытуемого образца в реакционные сосуды прибавляют 5,0 мл азотной кислоты концентрированной и 0,5 мл водорода пероксида.

Закрытые реакционные сосуды помещают в микроволновую печь и разлагают образец, используют программу микроволнового разложения указанную ниже или другую соответствующую программу. После завершения разложения раствор охлаждают и количественно переносят в пробирки вместимостью 50 мл, доводят объем раствора водой для хроматографии до 50 мл и перемешивают (испытуемый раствор). Используют испытуемый раствор и контрольный раствор для испытуемого образца для измерения.

Рекомендуемая программа микроволнового разложения:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Стадия | Время (мин) | Т (°С) | Мощность (Вт) |
| нагревание | 30 | Тстарт - 240 | ≥1000 |
| температура выдерживания | 15 | 240 | ≥1000 |

Испытуемый раствор используют свежеприготовленным.

Основной стандартный раствор кобальта (1,0 мг/л).

В пробирки вместимостью 50 мл помещают 50 мкл стандартного раствора кобальта (1000 мг/л) и 5,0 мл азотной кислоты концентрированной, доводят объем раствора водой для хроматографии до 50 мл и перемешивают.

Основной стандартный раствор кобальта (10 мкг/л)

В пробирки вместимостью 50 мл помещают 500 мкл основного стандартного раствора кобальта (1,0 мг/л) и 5,0 мл азотной кислоты концентрированной, доводят объем раствора водой для хроматографии до 50 мл и перемешивают.

Контрольный раствор. В пробирки вместимостью 50 мл, помещают 1,0 мл азотной кислоты концентрированной доводят объем раствора водой для хроматографии до 50 мл и перемешивают.

Калибровочные растворы кобальта

В пробирки вместимостью 50 мл, помещают стандартный раствор кобальта (10 мкг/л) в количествах: 500 мкл; 800 мкл и 1250 мкл, азотной кислоты концентрированной, доводят объем раствора водой для хроматографии до 50 мл и перемешивают (получают растворы с содержанием кобальта соответственно 0,1 мкг/л; 0,16 мкг/л; и 0,25 мкг/л.

Контрольный стандартный раствор кобальта (0,16 мкг/л).

В пробирки вместимостью 50 мл помещают 50 мкл стандартного раствор кобальта (1000 мг/л) и 5,0 мл азотной кислоты концентрированной, доводят объем раствора водой для хроматографии до 50 мл и перемешивают (КР-1).

В пробирки вместимостью 50 мл помещают 500 мкл раствора КР-1 и 5,0 мл азотной кислоты концентрированной, доводят объем раствора водой для хроматографии до 50 мл и перемешивают (КР-2).

В пробирки вместимостью 50 мл помещают 800 мкл раствора КР-2 и 5,0 мл азотной кислоты концентрированной, доводят объем раствора водой для хроматографии до 50 мл и перемешивают. Получают контрольный стандартный раствор кобальта (0,16 мкг/л).

*Рекомендуемые параметры (для масс-спектрометра):*

Мощность: 1600 Вт

Поток распылителя: 1,05 л/мин

Перистальтический насос: 0,1 об/сек

Распылитель: концентрический стеклянный микропотоковый распылитель

Распылительная камера: кварцевое стекло, двухходовая

Горелка: кварцевое стекло, диаметр инжектора

2,5 мм

Конус семплера и скиммера: никель

Масса испытуемого/внутреннего стандарта/Режим: Со (59)/Внутренний

стандарт Sc (45)/Нет газа

⃰Может быть использован другой тип распылителя, распылительной камеры, горелки и конус семплера и/или скиммера.

При использовании другой модели прибора или прибора другого производителя параметры могут быть оптимизированы или изменены.

Прибор устанавливают в соответствии с инструкциями производителя и оптимизируют их (проверка пригодности системы), если не указано иное.

На основании измеренного отношения (Стандартный раствор испытуемого вещества/стандартный раствор внутренного стандарта) рабочих стандартных растворов получают калибровочные кривые для кобальта. Затем проводят измерение контрольного стандартного раствора кобальта (КСР1), контрольного раствора для испытуемого образца (КРИР), а затем испытуемого раствора (ИР-1) и соответствующего рабочего стандартного раствора (для определения пригодности, например, КСР 2) в конце.

По калибровочной кривой определяют концентрацию кобальта в образце. Концентрацию цианокобаламина (витамина В12) рассчитывают через кобальт с использованием молекулярных масс. Результат - среднее значение по двум повторностям испытуемой порции.

|  |  |
| --- | --- |
| Параметр | Критерии |
| Коэффициент корреляции (R) | R ≥ 0,99 |
| КСР 1 (0,16 мкг/л) | ± 10 % от предпологаемого значения |
| Пригодность системы (РСР 2, 0,16 мкг/л) | ± 10 % от предпологаемого значения |

Раствор внутреннего стандарта Bi, In, Li6, Sc, Tb, Y (1000 мкг/л) вводят в режиме «онлайн» через перистальтический насос, где смешиваются испытуемый раствор и раствор внутренного стандарта в Т-образном коннекторе (комплект для добавления внутреннего стандарта в режиме «онлайн»).

⃰Может быть использован другой подходящий способ введения раствора внутреннего стандарта.

Содержание цианокобаламина (витамина В12) (X) в мкг/5 мл препарата вычисляют по формуле:

Х=,

где: C - концентрация кобальта в испытуемом растворе, мкг/л;

C0 - концентрация кобальта в контрольном растворе для испытуемого

образца, мкг/л;

а - навеска испытуемого препарата, г;

1355,37 - молекулярная масса цианокобаламина (витамина В12);

58,93 - атомная масса кобальта;

р - плотность препарата, г/мл.

⃰Значение контрольного раствора для испытуемого образца (Cкрир) вычитают только в случае, если его автоматически не корректирует программное обеспечение.

**Аскорбиновая кислота.**  Метод Титриметрии.

*Дихлорфенолиндофенола натриевой соли раствор*. Около 0,5 г (точная навеска) дихлорфенолиндофенола натриевой соли помещают в лабораторный стакан, смачивают небольшим количеством холодной воды и перемешивают до образования высокодисперсной суспензии. Полученную суспензию помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, прибавляют воды до 500 мл, колбу защищают от воздействия света, взбалтывают на шейкере в течение 30 мин, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Раствор быстро фильтруют через складчатый фильтр «белая лента» с размером пор от 7 до 20 мкм во флакон темного стекла. Флакон хранят в холодильнике.

*Установка титра.* 5,0мл стандартного раствора помещают в высокий узкий лабораторный стакан, прибавляют 10 мл уксусной кислоты раствора 10 % (о/о) и 100 мл воды, тщательно перемешивают и быстро титруют раствором дихлорфенолиндофенола до розового окрашивания, не исчезающего в течение 30 с., - конечная точка титрования. При потенциометрическом, монотонном титровании в начале прибавляют соответствующую аликвоту раствора дихлорфенолиндофенола и продолжают титрование прибавляя 1,0 мл в минуту раствора дихлорфенолиндофенола постепенно по 0,1 мл. Используют комбинированный платиновый электрод. Одновременно титруют контрольный образец.

Расчет титра:

Е=мг/мл=,

где: ао – навеска аскорбиновой кислоты, которая содержится 5 мл

стандартного раствора, мг;

Р - содержание аскорбиновой кислоты в стандартном образце на основе «как есть», мг/мг;

V1 - объем раствора дихлорфенолиндофенола, пошедший на титрование стандартного раствора, мл;

V2 - объем раствора дихлорфенолиндофенола, пошедший на титрование контрольного образца, мл.

Раствор стандартного образца аскорбиновой кислоты. Стандартный раствор готовят непосредственно перед использованием. Около 50,0 мг (точная навеска) стандартного образца аскорбиновой кислоты, помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в воде, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

*Испытуемый раствор*. Точную навеску препарата, эквивалентную 3,0 мг аскорбиновой кислоты помещают в высокий лабораторный стакан, прибавляют 10 мл уксусной кислоты раствора 10 % и 100 мл воды и перемешивают.

Быстро титруют раствором дихлорфенолиндофенола до розового окрашивания, не исчезающее в течение 30 с, - конечная точка титрования. При потенциометрическом, монотонном титровании в начале прибавляют соответствующую аликвоту раствора дихлорфенолиндофенола и продолжают титрование прибавляя 1,0 мл в минуту дихлорфенолиндофенола раствора постепенно по 0,1 мл. Используют комбинированный платиновый электрод.

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

Х=

где: V - объем раствора дихлорфенолиндофенола, пошедший на титрование

испытуемого образца, мл;

Е - титр раствора дихлорфенолиндофенола, мг/мл;

р - плотность препарата, г/мл;

а - навеска препарата, г;

L - заявленное количество аскорбиновой кислоты в препарате, мгмл;

100 - пересчет %.

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