**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |  |
| --- | --- |
| **Аскорбиновая кислота + Кальция пантотенат + Колекальциферол + Никотинамид + Пиридоксина гидрохлорид + Ретинола ацетат + Рибофлавин + Тиамина нитрат + альфа-Токоферол ацетат + Фолиевая кислота + Цианокобаламин + Железо + Йод + Кальций + Магний + Марганец + Медь + Селен + Цинк + Хром, таблетки*****Acidum ascorbicum + Calcium pantotenas + Colecalciferolum + Nicotinamidum + Pyridocxini hydrochloridum + Retinoli acetas + Riboflavinum + Thiamini nitras + a-Tocopheryli acetas + Acidum folicum + Cyanocobalaminum + Ferrum + Iodum + Calcium + Magnesium + Manganum + Cuprum + Selenium + Zincum + Chromium, tabulettae***  |  **ФС**  **Вводится впервые** |

Настоящая фармакопейная статья распространяется на лекарственный препарат Аскорбиновая кислота + Кальция пантотенат + Колекальциферол + + Никотинамид + Пиридоксина гидрохлорид + Ретинола ацетат + Рибофлавин + Тиамина нитрат + альфа-Токоферол ацетат + Фолиевая кислота+ Цианокобаламин + Железо + Йод + Кальций + Магний + Марганец + Медь + Селен + Цинк + Хром, таблетки.

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

Препарат содержит от заявленного количества:

̶ аскорбиновой кислоты C6H8O6 не менее 90 % и не более 150 %;

̶ кальция пантотената C18H32CaN2O10 не менее 90 % и не более 150 %;

̶ колекальциферола C27H44O не менее 90 % и не более 165 %;

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

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

 ̶ ретинола ацетата С22Н32О2 не менее 90 % и не более 165 %;

̶ рибофлавина C17H20N4O6 не менее 90 % и не более 150 %;

̶ тиамина нитрата C12H17N4OSˑNO3  не менее 90 % и не более 150 %;

̶ альфа-токоферола ацетата С31Н52О3 не менее 90 % и не более 165 %;

̶ фолиевой кислоты C₁₉H₁₉N₇O₆ не менее 90 % и не более 150 %;

̶ цианокобаламина C63H88CoN14O14P не менее 90 % и не более 150 %;

̶ кальция карбоната CaCO3 в пересчете на кальций не менее 90 % и не более 150 %;

̶ железа фумарата FeC4H2O4 в пересчете на железо не менее 90 % и не более 150 %;

̶ магния оксида MgO в пересчете на магний не менее 90 % и не более 150 %;

̶ меди сульфата CuSO4 безводного в пересчете на медь не менее 90 % и не более 125 %;

̶ цинка оксида ZnO в пересчете на цинк не менее 90 % и не более 125 %;

̶ хрома хлорида гексагидрата CrCl3·6H2O в пересчете на хром не менее 90 % и не более 125 %;

̶ марганца сульфата MnSO4·H2O моногидрата в пересчете на марганенец менее 90 % и не более 125 %;

̶ натрия селената безводного Na2SeO4 в пересчете на селен не менее 90 % и не более 125 %;

̶ калия йодида KI в пересчете на йод не менее 90 % и не более 125 %.

Описание. Содержание раздела должно соответствоватьтребованиям ОФС «Таблетки».

**Подлинность**

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

Время удерживания основных пиков на хроматограмме испытуемых растворов *ретинола ацетата,* колекальциферола, а-токоферола ацетата, т*иамина нитрата, рибофлавина, пиридоксина гидрохлорида, никотинамида, кальция пантотената, фолиевой кислоты, аскорбиновой кислоты, цианокобаламина* должно соответствовать времени удерживания пика соответствующего компонента на хроматограмме стандартного раствора.

*Атомно - эмиссионная спектрометрия с индуктивно - связанной плазмой*  по разделу «Количественное определение *Железо, Кальций, Магний, Марганец, Медь, Цинк*» в соответствии с ОФС «Атомно-эмиссионная спектрометрия».

Длина волны эмиссии минерала в испытуемом растворе должна соответствовать длине волны эмиссии минерала в стандартном растворе.

*Масс- спектрометрия с индуктивно - связанной плазмой (ИСП-МС)* по разделу «Количественное определение. *Хром, Селен, Йод*» в соответствии с ОФС «Масс-спектрометрия». Поглощение испытуемого раствора должно быть идентично поглощению стандартного раствора.

Хром - Идентифицируют по массе 52.

Селен -Идентифицируют по массе 78.

Йод - Идентифицируют по массе 127.

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

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

**Распадаемость.** Не более 30 мин. Определение проводят в соответствии с ОФС «Распадаемость таблеток и капсул» с использованием дисков.

**Количественное определение**

 Ретинол ацетат, альфа-токоферол ацетат. Определение проводят методом ВЭЖХ. (ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография»).

 Аммония ацетата раствор. Растворяют 38,5 г аммония ацетата и 1,0 мл триэтиламина в 1000 мл воды и перемешивают.

*Спиртосодержащий реактив.* Метанол⎯2- пропанол⎯Этанол 5:5:90.

Раствор для экстракции. Растворяют 150 г мочевины и 150 г аммония хлорида в 900 мл воды, прибавляют 40 мл спиртосодержащего реактива и 40 мл аммония гидроксида раствора и перемешивают.

Смесь растворителей. 2-пропанола⎯Тетрагидрофурана 10:90.

*Подвижная фаза А.* Раствор аммония ацетата⎯Метанол 10:90.

Подвижная фаза В. *трет-*Бутилметиловый эфир.

Испытуемый раствор. Точную навеску порошка растертых таблеток, эквивалентную по содержанию 1,6 мг ретинола ацетата, 20.0 мг альфа токоферола ацетата, помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 8,0 мл раствора для экстракции и 2 капли щелочной протеазы R, продуцируемая Bacillus licheniformis / Bacillus subtilis раствора. Перемешивают для диспергирования порошка вручную или используя встряхиватель типа вортекс. Смесь термостатируют при температуре 47±0,5 °С в течение 15 мин, прибавляют 50 мл смеси растворителей и встряхивают при температуре 15-25 °С около 15 мин. Прибавляют 25 мл 2-пропанола и встряхивают при 15-25 °С еще 5 мин. Объем содержимого колбы доводят 2-пропанолом до метки и перемешивают. Полученный раствор оставляют для осаждения твердых частиц перед отбором аликвоты для следующего разведения.

В мерную колбу вместимостью 25 мл переносят 2,0 мл раствора, доводят 2-пропанолом объем раствора до метки и перемешивают.

Раствор используют свежеприготовленным.

Исходный раствор *стандартного образца* ретинола ацетата. Около 135,0 мг (точная навеска) стандартного образца ретинола ацетата помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл прибавляют около 75 мл 2-пропанола и обрабатывают ультразвуком в течение 1 мин, помешивая вручную для растворения. Объем раствора в колбе доводят 2-пропанолом до метки и перемешивают.

 Раствор стандартного образца ретинола ацетата 12 МЕ/мл. В мерную колбу вместимостью 200 мл помещают 20,0 мл исходного раствора стандартного образца, доводят объем раствора 2-пропанолом до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

Исходный раствор *стандартного образца* альфа-токоферола ацетата. Около 100,0 мг (точная навеска) стандартного образца альфа-токоферола ацетата помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют около 75 мл 2-пропанола и обрабатывают ультразвуком в течение 1 мин, помешивая вручную для растворения. Объем раствора доводят 2-пропанолом до метки и перемешивают.

Раствор стандартного образца апьфа-токоферола ацетата *0,25 МЕ/мл*. В мерную колбу вместимостью 200 мл, помещают 50,0 мл исходного раствора стандартного образца альфа - токоферола ацетата, доводят объем раствора 2-пропанолом до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

Растворы для определения пригодности хроматографической системы. Приготовление аналогично приготовлению исходных растворов стандартных образцов ретинола ацетата и альфа-токоферола ацетата. Растворы используют свежеприготовленными.

Раствор сравнения. 2-пропанол.

Хроматографические условия.

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка: | 150 х 3,0 мм, силикагель октадецилсилильный для хроматографии, 5 мкм; |
| Температура колонки:  | 15-25 °С; |
| Детектор: | УФ, 325 нм для ретинола (примерно с 0 по 4 мин);УФ, 280 нм для альфа токоферола (примерно с 4 по 10 мин); |
| Объем пробы: | 10 мкл; |
| Скорость потока: | 1,0 мл/мин. |

Время хроматографирования: около 10 мин

Программа градиентного элюирования:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Время, мин | Подвижная фаза А (%) | Подвижная фаза В (%) |
| 0,0 | 83,0 | 17,0 |
| 1,33 | 83,0 | 17,0 |
| 7,33 | 30,0 | 70,0 |
| 7,43 | 83,0 | 17,0 |
| 10,00 | 83,0 | 17,0 |

Проверка пригодности хроматографической системы.

На хроматограмме раствора:

* *фактор асимметрии* (AS ) для пиков ретинола ацетата и альфа-токоферола ацетата на хроматограмме стандартного раствора - менее 2,0;
* *относительное стандартное отклонение* площадей пиков ретинола ацетата и альфа-токоферола ацетата для пяти последовательных инъекций стандартных растворов - не более 2,0 %;
* *степень извлечения* для ретинола ацетата и альфа-токоферола ацетата для стандартных растворов (средняя площадь пика, полученная после введения пяти последовательных инъекций стандартного раствора) и раствора для определения пригодности хроматографической системы - 97,5 % - 102,5 %;

Концентрацию ретинола ацетата С22Н32О2 и альфа-токоферола ацетата С31Н52О3 в стандартных растворах (С, МЕ/мл) вычисляют по формуле:

С=$a\_{0}∙P∙V\_{0}∙F,$

где: а0 - навеска стандартного образца ретинола ацетата и альфа-

токоферола ацетата, мг;

Р - содержание основного вещества в стандартном образце, доли единицы;

V0 - аликвота исходного стандартного раствора, используемая для

приготовлении стандартного раствора, мл;

F - фактор пересчета в МЕ/мл:

2906.98 МЕ/мг - для ретинола ацетата;

1 МЕ/мг - для альфа-токоферола ацетата

Содержание ретинола ацетата С22Н32О2 и альфа-токоферола ацетата С31Н52О3 в МЕ одной таблетке, (X1) вычисляют по формуле:

Х1=$\frac{S∙С∙G}{S\_{0}∙a∙L},$

где: S - площадь пика ретинола ацетата или альфа-токоферола ацетата на

хроматограмме испытуемого раствора;

S0 - площадь ретинола ацетата или альфа-токоферола ацетата на

хроматограмме стандартного раствора;

С – концентрация стандартного раствора, МЕ/мл;

a - навеска порошка таблеток для приготовления испытуемого

раствора, г;

G- средняя масса таблеток, мг.

Содержание ретинола С22Н32О2 в таблетке в микрограммах (Х2) вычисляют по формуле:

Х2 =Х1 $∙0,3$,

где: 0,3 фактор пересчета ME в мкг.

Содержание альфа-токоферола С31Н52О3 в таблетке в миллиграммах (Хз) вычисляют по формуле:

Х3=$\frac{Х\_{1}}{1,49}$,

где: 1,49 фактор пересчета ME в эквивалентное по активности количество альфа-токоферола в мг.

Содержание ретинола ацетата С22Н32О2 и альфа-токоферола ацетата С31Н52О3 в одной таблетке в процентах от заявленных количеств (X) вычисляют по формуле:

Х=$\frac{S∙a\_{0 }∙P∙G∙N}{S\_{0}∙a∙L∙N\_{0}},$

где: S - площадь пика ретинола ацетата или альфа- токоферола ацетата на

хроматограмме испытуемого раствора;

S0 - площадь ретинола ацетата или альфа- токоферола ацетата на

хроматограмме стандартного раствора;

a - навеска порошка таблеток для приготовления испытуемого

раствора, г;

a0- навеска стандартного образца ретинола ацетата и альфа-токоферола

ацетата для приготовления стандартного раствора, мг;

G- средняя масса таблеток, мг;

P - содержание ретинола ацетата или альфа-токоферола ацетата в

стандартном образце ретинола ацетат или альфа-токоферола ацетата

%;

L - заявленное количества ретинола ацетата или альфа-токоферола

ацетата в одной таблетке, мг;

N - коэффициент разведения испытуемого раствора;

N0  - коэффициент разведения при приготовлении основного раствора

стандартного образца ретинола ацетата или альфа-токоферола ацетата.

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

 Подвижная фаза А. Пентанол⎯гексан 6:994.

Подвижная фаза В. Пентанол⎯гексан 20:80.

Испытуемый раствор. Точную навеску порошка растертых таблеток эквивалентную около 25,0 мкг колекальциферола помещают в колбу вместимостью 250 мл, прибавляют 15 мл воды и интенсивно перемешивают до получения гомогенной суспензии. К содержимому колбы в указанном порядке прибавляют 25 капель (около 0,5 мл) щелочной протеазы раствора и 10,0 мл диметилсульфоксида, интенсивно перемешивают до полного смачивания порошка.

К содержимому колбы прибавляют 25 мл метанола и термостатируют при температуре около 47±0,5 °С, периодически перемешивая на встряхивателе типа вортекс, для улучшения растворения колекальциферола.

К содержимому колбы прибавляют около 10 г натрия хлорида и перемешивают для насыщения водной фазы. Колбу охлаждают до температуры 15–25 °С, прибавляют 50,0 мл гексана и экстрагируют с помощью мешалки типа агитатор в течение 15-20 мин.

Порцию содержимого колбы (40 мл) переносят в центрифужную пробирку и центрифугируют в течение 10 мин при 2500 об/мин для разделения фаз. Верхнюю фазу используют в качестве испытуемого раствора. Испытуемый раствор хранят при температуре 15-25 °С и при температуре 2-8 °С в течение 6 сут.

Растворы стандартных образцов колекальциферола.

Раствор стандартного образца колекальциферола 16 мкг/мл. Около 40,0 мг (точная навеска) стандартного образца колекальциферола (предварительно выдержанного в помещении до температуре 15–25 °С) помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в гексане, доводят объём раствора гексаном до метки и перемешивают. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 4,0 мл полученного раствора, доводят объем раствора гексаном до метки и перемешивают.

 Раствор стандартного образца С1 колекальциферола 0,38 мкг/мл. В мерную колбу вместимостью 250 мл помещают 6,0 мл раствора стандартного образца колекальциферола 16 мкг/мл, растворяют в гексане, доводят объем раствора гексаном до метки и перемешивают.

 Раствор стандартного образца С2 колекальциферола 0,8 мкг/мл. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 5,0 мл раствора стандартного образца растворяют в гексане, доводят объем раствора гексаном до метки и перемешивают.

 Раствор стандартного образца С3 колекальциферола 1,28 мкг/*мл.* В мерную колбу вместимостью 100 мл, помещают 8,0 мл раствора стандартного образца 16 мкг/мл растворяют в гексане, доводят объем раствора гексаном до метки и перемешивают.

Стандартные растворы хранят при температуре 2-8 °С в течение 6 сут

Раствор для определения пригодности хроматографической системы (раствор стандартного образца колекальциферола 16 мкг/мл.). В мерную колбу вместимостью 100 мл, помещают около 40,0 мг (точная навеска) стандартного образца колекальциферола (предварительно выдержанного до температуры 15–25 °С), растворяют в гексане, доводят объем раствора гексаном до метки и перемешивают.

В мерную колбу вместимостью 100 мл, помещают 4,0 мл раствора стандартного образца 16 мкг/мл доводят объем раствора гексаном до метки и перемешивают.

В мерную колбу вместимостью 100 мл, помещают 5,0 мл полученного раствора доводят объем раствора гексаном до метки и перемешивают.

Раствор хранят при температуре 2 - 8 °С в течение 6 сут.

Раствор сравнения - гексан

Хроматографические условия.

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка: | 250 х 4,6 мм, силикагель октадецилсилильный эндкепированный для хроматографии, 5 мкм; |
| Температура колонки:  | 25 °С; |
| Детектор: | УФ, 266 нм;  |
| Объем пробы: | 80 мкл; |
| Скорость потока: | 2,0 мл/мин. |

Время хроматографирования: около 30 мин

Программа градиентного элюирования:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Время, мин | Подвижная фаза А (%) | Подвижная фаза В (%) |
| 0,0 | 100,0 | 0,0 |
| 18,0 | 100,0 | 0,0 |
| 18,5 | 50,0 | 50,0 |
| 20,5 | 50,0 | 50,0 |
| 21,0 | 100,0 | 0,0 |
| 30,0 | 100,0 | 0,0 |

Проверка пригодности хроматографической системы.

На хроматограмме раствора:

*̶ фактор асимметрии (AS)* для пика колекальциферола на хроматограмме стандартного раствора С2 не менее 0,8 и не более 2,0;

*̶ относительное стандартное отклонение* площадей пиков колекальциферола для пяти последовательных инъекций стандартного раствора С2 - не более 2,0 %;

Если данные условия удовлетворяют требованиям, вводят в хроматограф стандартные растворы С1, С2 и С3 и раствор для определения пригодности хроматографической системы:

* *степень извлечения колекальциферола* для раствора для определения пригодности хроматографической системы по отношению к раствору стандартного образца С2 (средняя площадь пика, полученная после введения стандартного раствора) должна быть в пределах 97,5 % - 102,5 % (5 введений);
* *коэффициент линейности* для стандартных растворов С1, С2 и С3 - не менее 0,99.

Устанавливают хроматографические условия как указано выше, проводят калибровку колонки с помощью мобильной фазы А.

В жидкостной хроматограф последовательно вводят: раствор сравнения, раствор стандартного образца С2 (пять раз), раствор для определения пригодности хроматографической системы, растворы стандартных образцов С1, С2 и С3 и испытуемый раствор, регистрируют хроматограммы и определяют площади основного пика.

Концентрацию колекальциферола C27H44O в стандартных растворах для каждого уровня калибровки (Cn, МЕ/мл) вычисляют по формуле

С1 =$\frac{a\_{0 }∙P∙N∙V\_{1}}{N\_{0}}$,

С2 =$\frac{a\_{0 }∙P∙N∙V\_{2}}{N\_{0}}$,

С3 =$\frac{a\_{0 }∙P∙N∙V\_{3}}{N\_{0}}$,

где: а - навеска стандартного образца колекальциферола, мг;

Р - содержание основного вещества в стандартного образца в долях

единицы.

Vn – объем исходного стандартного раствора, мл.

Содержание колекальциферола C27H44O в таблетке в ME (X) вычисляют по формуле:

X=$\frac{C\_{c}∙G∙50}{a}$,

где: Cс - концентрация испытуемого образца в МЕ/мл, полученная по

 калибровочной кривой (площади по отношению к МЕ/мл);

а - навеска испытуемого образца, в граммах;

G - средняя масса таблетки, г.

Содержание колекальциферола C27H44O в таблетке в микрограммах (Y) вычисляют по формуле:

Y=X$∙0,025,$

где: Х - содержание колекальциферола в таблетке, ME

0,025- фактор пересчета ME в мкг.

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

Х=$\frac{S ∙a\_{0}∙P∙G∙Nˑ1,09}{S\_{0}∙a∙L∙N\_{0}},$

где: S - площадь пика колекальциферола на хроматограмме испытуемого

 раствора;

S0 - площадь колекальциферола на хроматограмме раствора стандартного образца;

a0- навеска стандартного образца колекальциферола для приготовления

раствора стандартного образца, мг;

a - навеска порошка таблеток для приготовления испытуемого

раствора, мг;

G- средняя масса таблеток, мг;

P - содержание колекальциферола в стандартном образце

 колекальциферола %;

L - заявленное количества колекальциферола в одной таблетке, мг;

N - коэффициент разведения испытуемого раствора;

N0  - коэффициент разведения при приготовлении основного раствора

стандартного образца колекальциферола.

1,09 - коэффициент коррекции, используемый для учета среднего

количества провитамина D3, присутствующего в пробе.

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

*Раствор для экстракции.*  Растворяют 5,0 г аммония тиоцианата в 960 мл диметилсульфоксида, прибавляют 40,0 мл уксусной кислоты ледяной и перемешивают.

Подвижная фаза А. *Буферный раствор натрия гексансульфоната pH 3,5 0,006 М.* Растворяют 4,7 г натрия гексансульфоната в 4000 мл воды, прибавляют 5,0 мл фосфорной кислоты концентрированной, перемешивают, доводят значение pH до 3,5±0,05 с помощью калия гидроксида раствора 50 %.

Подвижная фаза В. Ацетонитрил.

Испытуемый раствор. Точную навеску порошка растертых таблеток эквивалентное по содержанию 0,94 мг тиамина нитрата, 1,08 мг рибофлавина, 1,345 мг пиридоксина гидрохлорида, 4,03 мг пантотеновой кислоты, 12,1 мг никотинамида и 179,4 мкг фолиевой кислоты, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл. Прибавляют около 5,0 мл раствора для экстракции, перемешивают с помощью мешалки для смачивания порошка и обрабатывают ультразвуком в течение 5 мин при температуре 15-25 °С, постоянно помешивая колбу во время обработки ультразвуком. К содержимому колбы прибавляют 10,0 мл натрия тиосульфата раствора 1 % и около 50 мл уксусной кислоты раствора 1 %. Содержимое колбы перемешивают на мешалке в течение 10 мин, доводят уксусной кислоты раствором 1 % до метки и перемешивают.

При необходимости фильтруют порцию испытуемого раствора через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм, отбрасывая первые 2 мл фильтрата. Раствор хранят при температуре 15-25 °С или при температуре 2-8 °С в течение 1 сут.

Растворы стандартных образцов.

Допускается приготовление растворов стандартных образцов, содержащих только те витамины, которые необходимо определить.

Стандартный раствор *никотинамида, кальция пантотената, пиридоксина гидрохлорида, тиамина нитрата*, *рибофлавина*. Около 200,0 мг (точная навеска) стандартного образца никотинамида, около 75,0 мг (точная навеска) стандартного образца кальция пантотената, около 35,0 мг (точная навеска) стандартного образца пиридоксина гидрохлорида, около 20,0 мг (точная навеска) стандартного образца тиамина нитрата и около 25,0 мг стандартного образца рибофлавина помещают в мерную колбу вместимостью 200 мл, прибавляют около 10 мл раствора для экстракции и обрабатывают ультразвуком в течение 5 мин при температуре 15-25 °С.

К раствору прибавляют около 150 мл уксусной кислоты раствора 1 %, перемешивают с помощью мешалки в течение 10 мин, доводят уксусной кислоты раствором 1 % до метки и перемешивают. Стандартный раствор хранят в защищенном от света месте температуре 15-25 °С в течение 9 сут (включая день приготовления).

⃰Если при стоянии и хранении раствора наблюдается опалесценция, то перед последующим разведением осторожно нагревают его до температуры не выше 25 °С.

Раствор стандартного образца фолиевой кислоты. Около 20,0 мг (точная навеска) стандартного образца фолиевой кислоты количественно переносят в мерную колбу вместимостью 200 мл, прибавляют около 100 мл натрия гидрокарбоната раствора 0,05 М и обрабатывают ультразвуком в течение 5 мин при температуре 15-25 °С. Доводят объем раствора натрия гидрокарбоната раствором 0,05 М до метки и перемешивают с помощью мешалки. Исходный стандартный раствор хранят в защищенном от света месте при температуре 15-25 °С в течение 9 сут.

Стандартный раствор *никотинамида, кальция пантотената, пиридоксина гидрохлорида, тиамина нитрата*, *рибофлавина и* *фолиевой кислоты*. В мерную колбу вместимостью 100 мл переносят 10,0 мл стандартного раствора никотинамида, кальция пантотената, пиридоксина гидрохлорида, тиамина нитрата, рибофлавина и 2,0 мл раствора стандартного образца фолиевой кислоты, прибавляют 10 мл натрия тиосульфата раствора 1 % и доводят уксусной кислоты раствором 1 % до метки и перемешивают. Фильтруют порцию стандартного раствора через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм, отбрасывая первые 2 мл фильтрата. Раствор используют свежеприготовленным.

Раствор для определения пригодности хроматографической системы.

Приготовление аналогично приготовлению стандартного раствора. Раствор используют свежеприготовленным.

Раствор сравнения. В мерную колбу вместимостью 10 мл переносят 1,0 мл натрия тиосульфата раствора 1 % и доводят уксусной кислоты раствором 1 % до метки и перемешивают.

Хроматографические условия.

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка: | 100 х 4,6 мм, силикагель октадецилсилильный, 2,7 мкм ; |
| Температура колонки:  | 35 °С; |
| Детектор: | УФ, 280 нм для пиридоксина, тиамина, рибофлавина, фолиевой кислоты;УФ, 250 нм для никотинамида;УФ, 210 нм для пантотеновой кислоты; |
| Скорость потока: | 1,0 мл/мин и 1,5 мл/мин; |
| Объем пробы:Время хроматографирования: | 10 мкл.около 16 мин. |

Времена удерживания: Никотинамид около 1,9 мин; Пантотеновая кислота около 2,7 мин; Пиридоксин около 5,7 мин; Фолиевая кислота около 9,0 мин; Тиамин около 10,7 мин; Рибофлавин около 12,8 мин.

Программа градиентного элюирования:

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Время,мин | Подвижная фаза А (%) | Подвижная фаза В (%) | Скорость потока (мл/мин) | Шаг |
| 0,0 | 96,0 | 4,0 | 1,0 | Шаг 1 |
| 4,0 | 96,0 | 4,0 | 1,0 |
| 4,1 | 96,0 | 4,0 | 1,5 | Шаг 2 |
| 11,0 | 91,0 | 9,0 | 1,5 |
| 12,0 | 87,0 | 13,0 | 1,5 | Шаг 3 |
| 12,5 | 87,0 | 13,0 | 1,5 |
| 12,6 | 65,0 | 35,0 | 1,5 | Промывка |
| 14,0 | 65,0 | 35,0 | 1,5 |
| 14,1 | 96,0 | 4,0 | 1,0 | Уравновешивание |
| 16,0 | 96,0 | 4,0 | 1,0 |

* После проведения анализа промывают колонку согласно условиям промывания колонки, указанным в таблице ниже. В условия, при необходимости, могут быть внесены корректировки.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Время, мин | Ацетонитрил, % | Вода, % |
| 0,00 | 10 | 90 |
| 20,00 | 10 | 90 |
| 20,10 | 90 | 10 |
| 40,00 | 90 | 10 |

*Проверка пригодности хроматографической системы.*

На хроматограмме раствора:

*̶ фактор асимметрии (AS ) для пиков* витаминов на хроматограмме стандартного раствора - не более 2,5;

*̶ относительное стандартное отклонение* площадей пиков каждого витамина для шести последовательных инъекций стандартного раствора - не более 3,0 %;

*̶ степень извлечения каждого витамина* для раствора для определения пригодности хроматографической системы по отношению к стандартному раствору (средняя площадь пика, полученная после введения шести последовательных инъекций стандартного раствора) должна быть в пределах 95,0 % - 105,0 %;

̶ *суммарное относительное стандартное отклонение* площадей пиков каждого витамина, инъекциям стандартного раствора, промежуточным инъекциям стандартного раствора и заключительной инъекции стандартного раствора - не более 3,0 % (6 введений).

В жидкостной хроматограф раздельно вводят растворы в следующей последовательности: раствор сравнения, испытуемый раствор для проверки разделения между пиком тиамина и пиком 1 (пик плацебо), стандартный раствор (шесть раз), раствор для определения пригодности хроматографической системы и испытуемый раствор.

Содержание тиамина нитрата C12H17N4OSˑNO3 в пересчете на тиамин гидрохлорид C12H17N4OS·HCl, рибофлавина C17H20N4O6, пиридоксина гидрохлорида C8H11NO3·HCI, никотинамида С6Н6N2O, пантотеновой кислоты C9H17NO5 и фолиевой кислоты C₁₉H₁₉N₇O₆ (X) в таблетке в процентах от заявленного количества вычисляют по формулам:

Х=$\frac{S∙ a.\_{0} ∙N∙P∙G∙F}{S\_{0}∙a∙N\_{0 }∙L}$,

где: S - площадь пика витамина на хроматограмме испытуемого раствора;

So - площадь пика витамина на хроматограмме стандартного раствора;

ао - навеска стандартного образца, г;

a - навеска испытуемого образца, г;

G - средняя масса таблеток, г;

Р - содержание витамина в стандартном образце, %;

F- фактор пересчета:

для тиамина нитрата на тиамина гидрохлорид - 1,0303

для рибофлавина -1

для пиридоксина гидрохлорида-1

для никотинамида -1

для пантотеновой кислоты - 0,92.

N - коэффициент разведения испытуемого раствора;

N0 - коэффициент разведения при приготовлении основного раствора

стандартного образца тиамина гидрохлорида, пиридоксина гидрохлорида, никотинамида, рибофлавина, пантотеновой кислоты, фолиевой кислоты;

L - заявленное количество тиамина нитрата, пиридоксина гидрохлорида, никотинамида, рибофлавина, пантотеновой кислоты, фолиевой кислоты в одной таблетке, г.

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

Разбавитель. Метанол⎯Буферный раствор калия дигидрофосфата pH 4,5 16:84.

Раствор для экстракции. В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 5 г аммония тиоцианата, растворяют в буферном растворе калия дигидрофосфата p H 4,5±0,05 200 мМ и доводят этим же раствором объем до метки, перемешивают.

Раствор для десорбции. Метанол⎯Буферный раствор калия дигидрофосфата pH 4,5 4:6.

Раствор для промывания. В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 13,6 г калия дигидрофосфата и 3,4 г натрия гидроксида, растворяют в воде. Доводят pH раствора до 7,5±0,05 с помощью натрия гидроксида раствора 50 % или фосфорной кислоты концентрированной и перемешивают.

Подвижная фаза А. Буферный раствор калия дигидрофосфата pH 4,5±0,05.

Подвижная фаза В. Ацетонитрил⎯подвижная фаза А 4:6.

Испытуемый раствор. Точную навеску порошка растертых таблеток эквивалентную по содержанию 2,0 мкг цианокобаламина количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл. Прибавляют около 70 мл раствора для экстракции и диспергируют порошок с помощью встряхивателя. Содержимое колбы перемешивают с помощью мешалки в течение 30 мин при 300 об/мин. Объем содержимого колбы доводят раствором для экстракции до метки и перемешивают. Переносят содержимое колбы в пластиковую центрифужную пробирку вместимостью 50 мл и центрифугируют в течение 5 мин при 4000 об/мин. Часть центрифугата фильтруют, используя бумажный 150 мм или аналогичный фильтр (раствор для твердофазной экстракции ТФЭ).

Устанавливают устройство для твердофазного вакуумного распыления при около 50 кПа. Первой устанавливают колонку для твердофазной экстракции которая содержит гидрофильный, сильный анионообменник на основе диоксида кремния (кремнезем) с большим размером пор (300Å), 360 мг сорбента, 37- 55 мкм. В качестве неполярных заместителей, прививаемых к силикагелю, используют алкильные радикалы (С18, циклогексил). После чего проводят кондиционирование колонок с использованием 10 мл метанола, затем три раза по 5 мл воды (до общего количества 15 мл воды), после чего 5 мл раствора для промывания.

Необходимо соблюдать осторожность, чтобы обе колонки не пересохли. Переносят 30 мл предварительно профильтрованного объема испытуемого раствора и приступают к твердофазной экстракции.

Колонки промывают с использованием 5 мл раствора для промывания (данная операция позволяет перенести весь остаточный цианокобаламин из патрона (картриджа) для ТФЭ), снимают колонку. Помещают под колонку (С18) - ТФЭ для твердофазной экстракции с силикагелем мерную колбу вместимостью 10 мл для сбора цианокобаламина, элюируемого с 7 мл раствора для десорбции (дают колонке высохнуть, чтобы провести полную десорбцию), затем добавляют 2 мл буферного раствора калия дигидрофосфата (pH 4,5) и доводят объем до метки буферным раствором калия дигидрофосфата (pH 4,5). Этот раствор используют в качестве испытуемого раствора, анализируя методом ВЭЖХ. Испытуемый раствор хранят при температуре 15-25 °С или при температуре 2-8 °С в течение 5 сут.

Исходный раствор стандартного образца цианокобаламина. Около 49,0 мг (точная навеска) стандартного образца цианокобаламина помещают в мерную колбу вместимостью 250 мл, растворяют в воде, доводят этим же растворителем до метки и перемешивают.

Растворы стандартных образцов

Раствор стандартного образца цианокобаламина С1 (концентрация 0,0196 мкг/мл). В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 10,0 мл исходного раствора стандартного образца, доводят разбавителем до метки и перемешивают.

Раствор стандартного образца цианокобаламина С2 (концентрация 0,196 мкг/мл). В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 5,0 мл исходного раствора стандартного образца, доводят разбавителем до метки и перемешивают.

 Раствор стандартного образца цианокобаламина С3 (концентрация 0,49 мкг/мл). В мерную колбу вместимостью 20 мл помещают 5,0 мл исходного раствора стандартногообразца, доводят разбавителем до метки и перемешивают. Растворы используют свежеприготовленными.

Раствор для определения пригодности хроматографической системы.

Исходный раствор готовят аналогично исходному раствору стандартного образца. В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 5,0 мл исходного раствора стандартного образца, доводят объем раствора разбавителем до метки и перемешивают. (концентрация 0,196 мкг/мл). Раствор хранят в защищенном от света месте при температуре 2-8 °С в течение 7 сут.

Раствор сравнения. Буферный раствор калия дигидрофосфата pH 4,5.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка: | 150 х 4,6 мм, силикагель октадецилсилильный, 3 мкм, 120А;  |
| Температура колонки:  | 45 °С; |
| Детектор: | УФ, 550 нм; |
| Объем пробы: | 200 мкл; |
| Скорость потока: | 1,0 мл/мин. |

Время хроматографирования: 11 мин.

Время удерживания цианокобаламина 5 – 8 мин.

При необходимости вносят изменения в хроматографические условия для достижения соответствия критериям пригодности хроматографической системы.

Программа градиентного элюирования:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Время, мин | Подвижная фаза А (%) | Подвижная фаза В (%) |
| 0,0 | 95,0 | 5,0 |
| 8,0 | 20,0 | 80,0 |
| 9,0 | 95,0 | 5,0 |
| 11,0 | 95,0 | 5,0 |

Устанавливают требуемые параметры и уравновешивают хроматографическую систему с помощью подвижных фаз А и В (в соотношении 95:5) до установления устойчивой базовой линии.

Хроматографируют раствор для проверки разделительной способности хроматографической системы, раствор сравнения и испытуемый раствор.

*Пригодность хроматографической системы.*

На хроматограмме раствора:

̶ *эффективность хроматографической колонки*, рассчитанная по пику цианокобаламина - более 2500 теоретических тарелок;

̶ *фактор асимметрии* (*A*S ) для пика цианокобаламина на хроматограмме стандартного раствора С2 - менее 2,0;

̶ *относительное стандартное отклонение* площадей пиков цианокобаламина для пяти последовательных инъекций стандартного раствора С2 - не более 2 %.

Если условия выполняются, используя три стандартных раствора (С1, С2 и С3), строят калибровочную кривую, отражающую соотношение площадей пиков по отношению к концентрации в мкг/мл.

̶ *коэффициент линейности* для стандартных растворов С1, С2 и С3 - не менее 0,99;

̶ *степень извлечения цианокобаламина* для раствора при определении пригодности хроматографической системы по отношению к стандартному раствору С2 (средняя площадь пика стандартного раствора) должна быть в пределах 95 % - 105 % (5 введений).

Раздельно вводят в жидкостной хроматограф раствор сравнения, стандартный раствор С2 (пять раз), раствор для определения пригодности хроматографической системы, стандартные растворы С1, С2 и С3 и испытуемый раствор, регистрируют хроматограммы и определяют площади основного пика.

В конце последовательности еще раз вводят стандартный раствор С2 для определения отклонения. Отклонение в процентах должно быть не более 5 %.

Отклонение в процентах (Х) вычисляют по формуле:

Х=$\frac{S-S\_{ср}}{S\_{ср}}∙100,$

где: S - площадь пика цианокобаламина на хроматограмме стандартного

раствора, полученная после последней инъекции стандартного раствора С2;

Scp - средняя площадь пика цианокобаламина на хроматограмме

стандартного раствора С2, полученная после введения пяти последовательных инъекций данного стандартного раствора.

Используют калибровочную кривую для определения концентрации цианокобаламина в испытуемом растворе (мкг/мл).

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

Х=$\frac{С∙G∙P·F}{a∙L}$,

где: С - концентрация цианокобаламина в испытуемом растворе (мкг/мл);

а - навеска испытуемого образца, г;

G- средняя масса таблеток, г;

P - содержание цианокобаламина в стандартном образце

цианокобаламина, %;

L - заявленное количества цианокобаламина в одной таблетке, мг;

F – фактор разведения.

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

Аскорбиновая кислота обладает чувствительностью к свету, поэтому следует использовать светозащитную лабораторную посуду (посуду темного стекла и пробирки для ВЭЖХ), а так же держать пробирки для ВЭЖХ в защищенном от света месте.

Раствор для экстракции. В колбу подходящей вместимости переносят 10 г лимонной кислоты, 0,3±0,03 г L-цистеина гидрохлорида моногидрата и 0,3±0,03 г трис-(2-карбоксиэтил) фосфин гидрохлорида. Прибавляют 1000 мл метанола и перемешивают до полного растворения.

Разбавитель. В колбу переносят 10 г метафосфорной кислоты, 10 г лимонной кислоты, 0,3±0,03 г L-цистеина гидрохлорида моногидрата и 0,3±0,03 г трис-(2-карбоксиэтил) фосфина гидрохлорида. Прибавляют 1000 мл воды и перемешивают до полного растворения.

Фосфатный раствор 50 мМ. В подходящую емкость переносят 27,6±2,8 г натрия дигидрофосфата моногидрата и 9,7 г фосфорной кислоты концентрированной, прибавляют 4000 мл воды и перемешивают до полного растворения.

Рекомендуемый раствор для промывания иглы ВЭЖХ. Вода⎯метанол 5:5.

Подвижная фаза А. Фосфатный раствор 50 мМ фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм и дегазируют.

Подвижная фаза В. Метанол⎯50 мМ фосфатного раствора⎯20:80. Смесь фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм и дегазируют.

Испытуемый раствор. Точную навеску порошка растертых таблеток эквивалентную 20,0 мг аскорбиновой кислоты количественно переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют около 10 мл раствора для экстракции и встряхивают около 10 мин на мешалке, вновь прибавляют около 30 мл разбавителя и встряхивают около 30 мин на мешалке. Доводят объем содержимого колбы разбавителем до метки. При образовании пены, для ее удаления добавляют несколько капель раствора для экстракции перед доведением объема разбавителем до метки.

В мерную колбу вместимостью 25 мл переносят 2,0 мл верхнего слоя, доводят разбавителем до метки и перемешивают.

Фильтруют порцию полученного раствора через фильтр с размером пор 0,45 мкм в пробирку для ВЭЖХ, отбрасывая первые 2 мл фильтрата. Испытуемый раствор хранят при температуре 2-8 °С в течение 1 сут.

Раствор стандартного образца *аскорбиновой кислоты* *около 32 мкг/мл*. Около 40,0 мг (точная навеска) стандартного образца аскорбиновой кислоты помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в разбавителе, доводят разбавителем объем раствора до метки и перемешивают.

В мерную колбу вместимостью 100 мл переносят 4,0 мл полученного раствора, доводят разбавителем до метки и перемешивают. Стандартный раствор хранят при температуре 2-8 °С в течение 5 недель.

Раствор для определения пригодности хроматографической системы.

Приготовление аналогично приготовлению стандартного раствора. Раствор хранят при температуре 2-8 °С в течение 5 недель.

Раствор сравнения. Разбавитель

Хроматографические условия.

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка: | 150 х 4,6 мм, силикагель октадецилсилильный для хроматографии, 3 мкм; |
| Температура колонки: | 35 °С; |
| Температура образца: | 5 ±3 °С; |
| Детектор: | УФ, 260 нм; |
| Объем пробы: | 10 мкл; |
| Скорость потока: | 1,0 мл/мин. |

Время хроматографирования: около 10 мин

Программа градиентного элюирования:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Время, мин | Подвижная фаза А (%) | Подвижная фаза В (%) |
| 0,00 | 95,0 | 5,0 |
| 4,00 | 95,0 | 5,0 |
| 4,10 | 10,0 | 90,0 |
| 5,00 | 10,0 | 90,0 |
| 5,10 | 95,0 | 5,0 |
| 10,00 | 95,0 | 5,0 |

Рекомендуется установить заданную температуру колонки, используя скорость потока 0,5 мл/мин для предотвращения повышения давления.

Проверка пригодности хроматографической системы.

На хроматограмме раствора:

̶ *эффективность хроматографической колонки*, рассчитанная по пику аскорбиновой кислоты - более 2000 теоретических тарелок;

̶ *фактор асимметрии* (As) для пика аскорбиновой кислоты на хроматограмме стандартного раствора - менее 2,0;

̶ *относительное стандартное отклонение* площадей пиков аскорбиновой кислоты пяти последовательных инъекций стандартного раствора - не более 2,0 %;

̶ *степень извлечения аскорбиновой кислоты* для раствора для определения пригодности хроматографической системы по отношению к стандартному раствору (средняя площадь пика, стандартного раствора) и должна быть в пределах ± 2,5 % (5 введений).

Раздельно вводят в жидкостной хроматограф разбавитель в качестве раствор сравнения, стандартный раствор (пять раз), раствор для определения пригодности хроматографической системы и испытуемый раствор, регистрируют хроматограммы и определяют площади основного пика.

Содержание аскорбиновой кислоты C6H8O в таблетке в процентах от заявленного количества (X) вычисляют по формуле:

$Х=\frac{S∙a\_{0}∙N∙P∙G}{S\_{0}∙a∙L∙N\_{0}}$,

где: S - площадь пика аскорбиновой кислоты на хроматограмме испытуемого

 раствора;

So - площадь пика аскорбиновой кислоты на хроматограмме

стандартного раствора;

ао- навеска стандартного образца аскорбиновой кислоты, мг;

Р - содержание аскорбиновой кислоты в стандартном образце, %;

а - навеска испытуемого образца, мг;

G - средняя масса таблетки, мг;

L – заявленное количество аскорбиновой кислоты в одной таблетке, мг;

N - коэффициент разведения испытуемого раствора;

N0 - коэффициент разведения при приготовлении основного раствора

стандартного образца аскорбиновой кислоты.

***Кальций, магний, железо, цинк, медь и марганец****.* Метод атомно-эмиссионной спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой (АЭС-ИСП)

Лабораторную стеклянную посуду рекомендуется предварительно ополоснуть азотной кислотой для удаления возможных следовых количеств металлов.

Стандартные растворы сравнения.

Стандартный раствор ионов кальция с концентрацией 10000 мг/л Стандартный раствор ионов магния с концентрацией 10000 мг/л Стандартный раствор ионов железа с концентрацией 10000 мг/л Стандартный раствор ионов цинка с концентрацией 10000 мг/л

Стандартный раствор ионов меди с концентрацией 1000 мг/л

Стандартный раствор ионов марганца с концентрацией 1000 мг/л

Допускается использование стандартных растворов сравнения других концентраций. В таком случае необходимо внести соответствующие изменения при приготовлении исходных стандартных растворов таким образом, чтобы получить заданные концентрации стандартных растворов.

Кислот раствор. В мерной колбе вместимостью 2000 мл смешивают 750 мл хлористоводородной кислоты 37 % и 375 мл азотной кислоты 65 % доводят водой до метки и перемешивают.

Исходный испытуемый раствор. В лабораторный стакан вместимостью 250 мл или аналогичную емкость помещают 8 таблеток и прибавляют 50 мл кислот раствора. Лабораторный стакан помещают на мешалку с подогревом, нагретую до температуры около 60 °С, и накрывают часовым стеклом. После того, как таблетки полностью распадаются, осторожно нагревают содержимое стакана для разложения в течение около 45 мин, постоянно помешивают содержимое стакана, вращая на мешалке, не доводя до кипения. Если его содержимое начинает кипеть, снимают стакан с мешалки. Как только кипение прекращается, снова нагревают. Следует прекратить помешивание содержимого за 10 мин до окончания времени разложения.

Прибавляют 50 мл раствора кислот в лабораторный стакан и продолжают процесс разложения на мешалке с подогревом при температуре около 60 °С в течение еще 45 мин. Общий объем на двух стадиях разложения должен составлять примерно 100 мл. Еще теплый супернатант переносят в мерную колбу вместимостью 200 мл, пропустив его через бумажный фильтр с размером пор 20 мкм.

Ополаскивают лабораторный стакан теплой водой. Собирают воду в ту же мерную колбу вместимостью 200 мл, пропустив ее через тот же фильтр.

Охлаждают содержимое колбы до температуры 15–25 °С, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Раствор хранят при температуре 15-25 °С в течение 7 сут.

Испытуемый раствор. Вмерную колбу вместимостью 200 мл помещают 3,0 мл исходного испытуемого раствора, доводят объем водой до метки и перемешивают. Испытуемый раствор хранят при температуре 15-25 °С в течение 7 сут.

Стандартные растворы.

Допускается приготовление разных объемов стандартных растворов при условии сохранения заданной концентрации минералов.

Исходный стандартный раствор.

Объемы стандартных растворов сравнения, указанные в таблице ниже, переносят пипеткой в мерную колбу вместимостью 250 мл.

|  |  |
| --- | --- |
| Элемент | Объем стандартного раствора сравнения (мл) |
| Кальций | 45,0 |
| Магний | 25,0 |
| Медь | 6,0 |
| Железо | 5,0 |
| Марганец | 13,0 |
| Цинк | 4,0 |

Прибавляют в колбу 33 мл раствора кислот, доводят объем полученного раствора водой до метки и перемешивают. Раствор хранят при температуре 15-25 °С в течение 19 сут.

Стандартные растворы минералов.

Стандартный раствор минералов М1. В мерную колбу вместимостью 200 мл помещают 1,0 мл исходного стандартного раствора, прибавляют 1,25 мл кислот раствора, доводят объем полученного раствора водой до метки и перемешивают.

 Стандартный раствор минералов М2. В мерную колбу вместимостью 200 мл помещают 4,0 мл исходного стандартного раствора, прибавляют 1,0 мл кислот раствора, доводят объем полученного раствора водой до метки, перемешивают.

 Стандартный раствор минералов М3 . В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 4,0 мл исходного стандартного раствора, прибавляют 0,25 мл кислот раствора, доводят объем полученного раствора водой до метки, перемешивают.

 Стандартный раствор минералов М4. В мерную колбу вместимостью 200 мл помещают 20,0 мл исходного стандартного раствора, прибавляют 0,125 мл кислот раствора, доводят объем полученного раствора водой до метки, перемешивают.

Стандартные растворы М1, М2 и М3 хранят при температуре 15-25 °С в течение 1 сут., стандартный раствор М4 используют свежеприготовленным.

Конечные теоретические концентрации минералов в стандартных растворах минералов приведены в таблице.

Стандартные растворы минералов: теоретические концентрации.

|  |  |
| --- | --- |
| Элемент | Концентрация стандартного раствора (мкг/мл) |
| М1 | М2 | М3 | М4 |
| Железо | 1,0 | 4,0 | 8,00 | 20,0 |
| Кальций | 9,0 | 36,0 | 72,0 | 180 |
| Магний | 5,0 | 20,0 | 40,0 | 100 |
| Марганец | 0,26 | 1,04 | 2,08 | 5,2 |
| Медь | 0,12 | 0,48 | 0,96 | 2,4 |
| Цинк | 0,8 | 3,2 | 6.40 | 16,0 |

Контрольный исходный стандартный раствор

В мерную колбу вместимостью 250 мл помещают указанные в таблице объемы стандартных растворов сравнения.

|  |  |
| --- | --- |
| Элемент | Объем стандартного раствора (мл) |
| Железо | 2,0 |
| Кальций | 20,0 |
| Магний | 12,0 |
| Марганец | 6,0 |
| Медь | 3,0 |
| Цинк | 2,0 |

Прибавляют 20,0 мл кислот раствора, доводят объем полученного раствора водой до метки и перемешивают. Раствор хранят при температуре 15-25 °С в течение 19 сут.

Контрольный стандартный раствор. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 7,0 мл контрольного исходного стандартного раствора, прибавляют 0,25 мл кислот раствора и доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Раствор хранят при температуре 15-25 °С в течение 1 сут.

Конечная теоретическая концентрация минералов в контрольном стандартном растворе приведена в таблице ниже.

|  |  |
| --- | --- |
| Элемент | Концентрация элементов в контрольном стандартном растворе (мкг/мл) |
| Железо | 5,60 |
| Кальций | 56,00 |
| Магний | 33,60 |
| Марганец | 1,68 |
| Медь | 0,84 |
| Цинк | 5,60 |

 Контрольная проба. В мерную колбу вместимостью 200 мл помещают 1,5 мл кислот раствора и доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

Рекомендуемые рабочие условия.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Радиочастотная (RF) мощность: | 1,35 кВт |  |
| Количество повторов: | 5 |  |
| Насос: | 1,8 мл/мин |  |
| Давление распылителя: | 0,65 л/мин |  |
| Вспомогательный поток газа: | 0,3 л/мин |  |
| Поток в пламени: | 15,0 л/мин |  |
| Режим считывания: | Радиальный |  |
| Длительность интегрирования: | Автоматически |  |
| Длины волн эмиссии: | Кальций | 317,933 |
|  | Магний | 279,078 |
|  | Медь | 324,754 |
|  | Железо | 238.204 |
|  | Марганец | 257,610 |
|  | Цинк | 213,857 |

Устанавливают параметры согласно описанию в разделе «Рекомендуемые рабочие условия».

Стабилизируют прибор с помощью контрольного раствора в течение как минимум 15 мин перед проведением анализа.

Калибруют прибор с помощью контрольного раствора и стандартных растворов М1 М2, М3 и М4 а затем проводят анализ испытуемого раствора.

Рекомендованная последовательность проведения анализа на приборе: контрольного раствора, стандартные растворы М1 М2, М3 и М4 для калибровки, контрольный стандартный раствор, испытуемые растворы.

После анализа каждых 8 испытуемых растворов снимают показания для контрольного стандартного раствора, что представляет собой снятие промежуточных показаний.

В конце каждой последовательности для проверки всегда следует снимать показания для контрольного стандартного раствора.

Проверка пригодности системы.

* *коэффициент линейности* (R2 ) - не менее 0,99, а коэффициент корреляции (R) - не менее 0,995;
* *относительное стандартное отклонение* интенсивности пяти повторностей для каждого стандартного раствора минералов - не более 5,0 %;
* *степень извлечения для контрольного стандартного* раствора по отношению к теоретической концентрации контрольного стандартного раствора должна быть в пределах 90 % - 110 %;
* *степень извлечения* для всех промежуточных показаний и заключительного показания для контрольного стандартного раствора по отношению к теоретической концентрации контрольного стандартного раствора должна быть в пределах 90 % - 110 %.

Концентрацию каждого минерала (кальций, марганец, медь, цинк, железо, марганец) в испытуемом растворе (С, мкг/мл) определяют с помощью программного обеспечения по следующей формуле:

С=$\frac{y-I}{b},$

где: у- интенсивность излучения минерала в испытуемом растворе;

1. отсекаемый отрезок калибровочной кривой для каждого минерала;

b - наклон калибровочной кривой для каждого минерала.

Содержание каждого минерала (кальций, магний, медь, цинк, железо, марганец) в таблетке в процентах от заявленного количества (X) вычисляют по формуле:

Х=$\frac{С∙G∙P·F}{a∙L}$,

где: С - концентрация минерала в испытуемом растворе, вычисленная по

 калибровочной кривой (мкг/мл);

а - навеска испытуемого образца, г;

G- количество таблеток для анализа;

P - содержание минерала в стандартном растворе минерала, %;

L - заявленное количества минерала в одной таблетке, мг;

F – фактор разведения.

 Хром, селен. Метод масс-спекгрометрии с индуктивно - связанной плазмой (ИСП-МС). Определение проводят в соответствии с ОФС «Масс-спекгрометрия».

Для приготовления растворов следует использовать только пластмассовые мерные колбы и пробирки с крышками.

Разбавитель: В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 200 мл воды прибавляют 30 мл метанола, 16 мл азотной кислоты 65 % и 8 мл хлористоводородной кислоты разведенной, доводят объем водой до метки и перемешивают. Раствор хранят при температуре 15-25 °С в течение - 1 мес.

Исходный испытуемый раствор. Около 1,0 г (точная навеска) порошка растертых таблеток переносят в пробирку для разложения, прибавляют 4,0 мл хлористоводородной кислоты разведенной 7,3 % и 8,0 мл азотной кислоты 65 %. Проводят процесс разложения при температуре 110 °С в течение 30 мин, используя систему для разложения (уже подготовленную к работе).

Для контроля температуры термометр рекомендуется погружать в пробирку для разложения, содержащую только 4,0 мл хлористоводородной кислоты разведенной и 8,0 мл азотной кислоты 65 %.

По окончании разложения пробирку охлаждают до температуры 15-25 °С, доводят объем содержимого пробирки водой до 50 мл и перемешивают.

Содержимое пробирки центрифугируют при 2500 об/мин в течение 5 мин и фильтруют супернатант вручную или с использованием фильтрационной системы через фильтр с размером пор 1,0 мкм.

Испытуемый раствор. Вмерную колбу вместимостью 50 мл переносят 1,0 мл исходного испытуемого раствора, доводят объем раствора разбавителем до метки и перемешивают. Раствор хранят при температуре 2-8 °С и при температуре 15-25 °С в течение 6 сут.

Стандартные растворы сравнения.

Многоэлементный стандартный раствор для ИСП-МС с концентрацией ионов 10 мг/л.

\* - находящийся в комплекте флакон со стандартным раствором ртути не используется. Допускается использование стандартных растворов сравнения, содержащих только селен и хром. При этом необходимо внесение соответствующих корректировок для получения стандартных растворов, содержащих каждый элемент в требуемой концентрации.

Стандартный раствор ионов германия с концентрацией 1000 мг/л для ИСП-МС.

Стандартный раствор ионов скандия с концентрацией 1000 мг/л для ИСП-МС.

Допускается использовать стандартные растворы сравнения с концентрациями, отличными от указанных выше. При этом необходимо вносить соответствующие корректировки в методики приготовлении стандартных растворов для получения заданных концентрации.

 Стандартные растворы.

Калибровочные стандартные растворы.

Стандартный раствор M1, концентрация 100 мкг/л (100 ррb). Вмерную колбу вместимостью 50 мл помещают 500 мкл многоэлементного стандартного раствора, доводят объем раствора разбавителем до метки, перемешивают.

 Cтандартный раствор М2, концентрация 50 мкг/л (50 ppb). В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 250 мкл многоэлементного стандартного раствора и доводят объем раствора разбавителем до метки, перемешивают.

 Cтандартный раствор М3 концентрация 25 мкг/л (25 ppb). В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 125 мкл многоэлементного стандартного раствора и доводят объем раствора разбавителем до метки, перемешивают.

Cтандартный раствор М4, концентрация 5 мкг/л (5 ppb). В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 2500 мкл стандартного раствора М1 и доводят объем раствора разбавителем до метки, перемешивают. Растворы для хрома используют свежеприготовленными, для селена хранят при температуре 15-25 °С в течение 4 сут.

Контрольный стандартный раствор (концентрация 25 мкг/л (25 ppb)). Вмерную колбу вместимостью 50 мл помещают 125 мкл многоэлементного стандартного раствора, доводят объем раствора разбавителем до метки и перемешивают.

Рекомендуемый раствор для промывания масс-спектрометра. В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 30 мл азотной кислоты 65 %, прибавляют 2 мл хлористоводородной кислоты 37 % доводят объем водой до метки и перемешивают.

Раствор внутренних стандартов для селена и хрома. Вмерную колбу вместимостью 50 мл помещают 100 мкл стандартного раствора ионов германия и 100 мкл стандартного раствора ионов скандия, доводят объем раствора разбавителем до метки и перемешивают.

Для хрома раствор используют свежеприготовленными, для селена срок годности раствора при температуре 15-25 °С в течение 4 сут.

Данный раствор добавляется автоматически во время инструментального анализа.

В качестве альтернативы растворы внутренних стандартов могут быть приготовлены отдельно для каждого элемента, как описано ниже.

Раствор внутреннего стандарта для селена. В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 100 мкл стандартного раствора ионов германия с концентрацией 1000 мг/л, доводят объем раствора разбавителем до метки и перемешивают. Раствор хранят при температуре 15-25 °С в течение 3 мес.

Данный раствор добавляется автоматически во время инструментального анализа.

Раствор внутреннего стандарта хрома. В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 100 мкл стандартного раствора ионов скандия с концентрацией 1000 мг/л, доводят объем раствора разбавителем до метки и перемешивают. Растворы хранят при температуре 15-25 °С в течение 1 мес.

Данный раствор добавляется автоматически во время инструментального анализа.

Контрольная проба. Разбавитель.

Изотопы для количественного определения селена.

Изотопы: 78Se ( 72Ge в качестве внутреннего стандарта).

Изотопы для количественного определения хрома.

Изотопы: 52Cr (45Sc в качестве внутреннего стандарта).

Перед началом анализа устанавливают режим работы прибора.

Уравновешивают прибор с помощью контрольной пробы в присутствии раствора внутреннего стандарта не менее чем за 15 мин до начала анализа.

До начала анализа следует удостовериться, что сигнал внутреннего стандарта стал стабильным.

Анализируют контрольную пробу, стандартный раствор, контрольный стандартный раствор и испытуемые растворы.

Рекомендуемая последовательность проведения анализа на приборе: контрольная проба, калибровочные стандартные растворы (М4, Мз, М2, М1), контрольный стандартный раствор, испытуемые растворы.

Степень извлечения для контрольного стандартного раствора по отношению к теоретической концентрации контрольного стандартного раствора должна быть в пределах 80 % - 120 %.

Интенсивности сигнала, измеренные на приборе, корректируются путем поправки на величину интенсивности сигнала для контрольной пробы.

Для определения хрома строится калибровочная кривая, отражающая соотношение между интенсивностью сигнала хрома и интенсивностью сигнала скандия по отношению к концентрации хрома в мкг/л.

Для определения селена строится калибровочная кривая, отражающая соотношение между интенсивностью сигнала селена и интенсивностью сигнала германия по отношению к концентрации селена в мкг/л.

Концентрация минералов (селена и хрома) в испытуемом растворе (С мкг/л) вычисляется непосредственно с помощью программного обеспечения или вручную, по формуле:

С=$\frac{y-I}{b},$

где: у - отношение между интенсивностью сигнала минерала и

интенсивностью сигнала внутреннего стандарта в растворе испытуемого образца;

I- отсекаемый отрезок калибровочной кривой для каждого минерала;

b- наклон калибровочной кривой для каждого минерала.

Содержание селена (Se) и хрома (Cr) в таблетке в процентах от заявленного количества (X) вычисляют по формуле:

Х=$\frac{С∙G∙P·F}{a∙L}$,

где: С - концентрация минерала в испытуемом растворе, вычисленная по

 калибровочной кривой (мкг/мл);

а - навеска испытуемого образца, г;

G- средняя масса таблеток, г;

P - содержание минерала в стандартном растворе минерала %;

L - заявленное количества минерала в одной таблетке, мг;

F – фактор разведения.

 **Йод.** Метод масс-спектрометрия с индуктивно - связанной плазмой (ИСП-МС). Определение проводят в соответствии с ОФС «Масс-спектрометрия».

Для приготовления растворов следует использовать только пластмассовые мерные колбы и пробирки с крышкой.

Стандартные растворы сравнения.

*Стандартный раствор калия йодида с концентрацией ионов йода 1000 мг/л.* Вскрытый флакон следует хранить при температуре 2-8 °С не более 3 мес.

*Стандартный раствор ионов теллура с концентрацией 1000 мг/л для ИСП-МС.*

Аммония гидроксида раствор *0,5 %*. В мерную колбу вместимостью 1000 мл переносят около 200 мл воды милли-Q, прибавляют 15,5 мл аммония гидроксида раствора 32 %, доводят объем раствора водой милли-Q до метки и перемешивают. Раствор хранят при температуре 15-25 °С в течение 2 недель.

Раствор для промывания масс-спектрометра: аммония гидроксида раствор 0,5 %.

Исходный испытуемый раствор. Около 1,0 г (точная навеска) порошка измельченных таблеток взвешивают и помещают в центрифужную пробирку вместимостью 50 мл. Прибавляют 40,0 мл аммония гидроксида раствора 0,5 %, перемешивают с помощью встряхивателя около 20 с для смачивания и диспергирования образца.

Пробирку нагревают на ультразвуковой бане при температуре 70±5 °С в течение 20 мин, помешивают с помощью встряхивателя около 20 с, охлаждают до температуры 15–25 °С и центрифугируют при 3000 об/мин в течение 10 мин. Около 5 мл содержимого пробирки фильтруют через фильтр с размером пор 0,45 мкм, отбрасывая первый миллилитр фильтрата.

Испытуемый раствор. В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 0,5 мл исходного испытуемого раствора, доводят объем содержимого колбы аммония гидроксида раствором 0,5 % до метки и перемешивают.

Стандартные растворы.

В случае использования стандартных растворов сравнения с концентрациями, отличающимися от указанных выше, необходимо вносить соответствующие корректировки в методики приготовления стандартных растворов для получения заданных концентраций.

Исходный стандартный раствор (концентрации 20 мкг/мл). В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 1,0 мл стандартного раствора калия йодида, доводят объем раствора аммония гидроксида раствором 0,5 % до метки и перемешивают.

 Исходный стандартный раствор (концентрации 1 мкг/мл). В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 2,5 мл полученного раствора и доводят объем раствора аммония гидроксида раствором 0,5 % до метки, перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

Калибровочные стандартные растворы.

Стандартный раствор M1, (концентрация 10 мкг/л (ррb)). Вмерную колбу вместимостью 50 мл помещают 500 мкл исходного стандартного раствора, доводят объем раствора аммония гидроксида раствором 0,5 % до метки и перемешивают (

Стандартный раствор M2, (концентрация 25 мкг/л (ррb)). Вмерную колбу вместимостью 50 мл помещают 1250 мкл исходного стандартного раствора, доводят объем раствора аммония гидроксида раствором 0,5 % до метки и перемешивают (

Стандартный раствор M3, (концентрация 50 мкг/л (ррb)). Вмерную колбу вместимостью 50 мл помещают 2500 мкл исходного стандартного раствора, доводят объем раствора аммония гидроксида раствором 0,5 % до метки и перемешивают (

Растворы используют свежеприготовленными.

Контрольный стандартный раствор (концентрация 25 мкг /л (ррb)).

Для приготовления раствора используют калия йодид ISO, или стандартный

раствор калия йодида с концентрацией ионов йодида 1000 мг/л.

Приготовление контрольного стандартного раствора, используя калия йодид ISO.

Исходный стандартный раствор калия йодида, (концентрация йода 2000 мкг/мл). Перед использованием 1,0 г калия йодида высушивают в сушильном шкафу при температуре 105 °С в течение 3 час, затем переносят в эксикатор и охлаждают до температуры 15–25 °С. В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают около 131,0 мг (точная навеска) калия йодида, растворяют, доводят аммония гидроксида раствором 0,5 % объем раствора до метки и перемешивают. Раствора хранят при температуре 15-25 °С в течение 1 мес.

Стандартный раствор калия йодида, (концентрация йода 20 мкг/мл). В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 0,5 мл исходного стандартного раствора калия йодида и доводят объем раствора аммония гидроксида раствором 0,5 % до метки, перемешивают. Раствора хранят при температуре 15-25 °С в течение 1 мес.

Стандартный раствор калия йодида, (концентрация йода 1 мкг/мл).

В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 2,5 мл стандартного раствора калия йодида (концентрация йода 20 мкг/мл), доводят объем раствора аммония гидроксида раствором 0,5 % до метки и перемешивают. Раствора хранят при температуре 15-25 °С в течение 1 мес.

Контрольный стандартный раствор калия йодида (концентрация йода 25 мкг/л (ррb)). В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 1,25 мл стандартного раствора калия йодида (концентрация йода 1 мкг/мл), доводят объем раствора аммония гидроксида раствором 0,5 % до метки и перемешивают. Используют свежеприготовленный раствор.

Раствор внутреннего стандарта. В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 100 мкл стандартного раствора ионов теллура, доводят объем раствора аммония гидроксида раствором 0,5 % до метки, перемешивают. Раствор хранят при температуре 15-25 °С в течение 1 мес.

Раствор внутреннего стандарта используют только для контроля стабильности прибора.

Контрольная проба. Аммония гидроксида раствор 0,5 %.

Изотопы для количественного определения йода.

Изотопы: 127I (125Те, внутренний стандарт только для проверки стабильности прибора).

Устанавливают режим работы прибора для анализа.

Раствор внутреннего стандарта вводится автоматически во время инструментального анализа.

Уравновешивают прибор с помощью контрольной пробы в присутствии раствора внутреннего стандарта не менее чем за 15 мин до начала анализа.

Перед началом анализа следует убедиться, что сигнал внутреннего стандарта стал стабильным.

Проводят анализ в следующей последовательности: контрольная проба, стандартный раствор, контрольный стандартный раствор и испытуемые растворы.

Рекомендуемая последовательность проведения анализа на приборе: контрольная проба, калибровочные стандартные растворы (М1, М2, M3), контрольный стандартный раствор, контрольная проба, испытуемые растворы (максимум 6 образцов), контрольная проба, контрольный стандартный раствор.

Степень извлечения для контрольного стандартного раствора по отношению к его теоретической концентрации должна быть в пределах 80 % - 120 %.

Интенсивности сигнала, измеренные на приборе, корректируются путем поправки на величину интенсивности сигнала для контрольной пробы.

Для определения концентрации йода строится калибровочная кривая, зависимости интенсивности сигнала йода от концентрации йода в мкг/л.

Концентрация йода (I) в испытуемом растворе (С, мкг/л) вычисляется непосредственно с помощью программного обеспечения или вручную, по формуле:

С=$\frac{y-I}{b},$

где: у - интенсивность сигнала йода в растворе испытуемого образца;

I- отсекаемый отрезок калибровочной кривой для йода;

b - наклон калибровочной кривой для йода.

Содержание йода (*I*) в таблетке в процентах от заявленного количества (X) вычисляют по формуле:

Х=$\frac{С∙G∙P·F}{a∙L}$,

где: С - концентрация йода в испытуемом растворе, вычисленная по

 калибровочной кривой (мкг/л);

а - навеска испытуемого образца, г;

G- средняя масса таблетки, г;

P - содержание йода в CO йода %;

L - заявленное количества йода в одной таблетке, мг;

F – фактор разведения.

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