**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |
| --- |
|  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Аскорбиновая кислота+Пиридоксина гидрохлорид+Ретинола ацетат+Рибофлавин+Рутозида тригидрат+Тиамина гидрохлорид+альфа-Токоферола ацетат+Фолиевая кислота+Цианокобаламин+Медь+Селен+Цинк+Зеаксантин+Лютеин, таблетки** |  | **ФС** |
| **Acidum ascorbicum+Pyridoxini hydrochloridum+Retinoli acetas+Riboflavinum+Rutosidi trihydricum+Thiamini hydrochloridum+alpha-Tocopherylis acetas+Acidum folicum+Cyanocobalaminum**+**Cuprum+Selenium+Zinсum+Zeaxanthynum+Luteinum, tabulettae** |  | **Вводится впервые** |

|  |
| --- |
|  |

Настоящая фармакопейная статья распространяется на лекарственный препарат аскорбиновая кислота+пиридоксина гидрохлорид+ретинола ацетат+рибофлавин+рутозида тригидрат+тиамина гидрохлорид+альфа-токоферола ацетат+фолиевая кислота+цианокобаламин+медь+ селен+цинк+зеаксантин+лютеин, таблетки (таблетки, покрытые пленочной оболочкой). Препарат должен соответствовать требованиям ОФС «Таблетки» и нижеприведенным требованиям.

Содержит от заявленного количества:

* аскорбиновую кислоту C6H8O6 – не менее 80,0 % и не более 130,0 %;
* пиридоксина гидрохлорид C8H11NO3·HCl – не менее 80,0 % и не более 130,0 %;
* ретинола ацетат C22H32O2 – не менее 80,0 % и не более 140,0 %;
* рибофлавин C17H20N4O6 – не менее 80,0 % и не более 130,0 %;
* рутозида тригидрат C27 H30 O16 · 3H2O в пересчете на рутозид безводный – не менее 90,0 % и не более 130,0 %;
* тиамина гидрохлорид C12H17ClN4OS·HCl – не менее 80,0 % и не более 130,0 %;
* α-токоферола ацетат С31Н52О3 – не менее 80,0 % и не более 140,0 %;
* фолиевую кислоту C19H19N7O6 – не менее 80,0 % и не более 150,0 %;
* цианокобаламин C63H88CoN14O14P – не менее 90,0 % и не более 150,0 %;
* зеаксантин C40H56O2 и лютеин C40H56O2 суммарно в пересчете на лютеин – не менее 80,0 % и не более 166,0 %;
* меди в форме меди(II) сульфата CuSO4·5H2O – не менее 90,0 % и не более 125,0 %;
* селена в форме натрия селенита Na2SeO3 – не менее 90,0 % и не более 160,0 %;
* цинка в форме цинка оксида – не менее 90,0 % и не более 125,0 %.

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

**Подлинность**

*ВЭЖХ.*Время удерживания основных пиков на хроматограммах испытуемых растворов должно соответствовать времени удерживания соответствующих пиков *пиридоксина гидрохлорида, ретинола ацетата,* *рибофлавина, рутозида, тиамина гидрохлорида, а-токоферола ацетата, фолиевой кислоты, цианокобаламина* на хроматограммах растворов стандартных образцов или стандартных растворов (раздел «Количественное определение»).

*Спектрофотометрия****.*** Спектр поглощения испытуемого раствора в области длин волн от 440 до 490 нм должен иметь максимум при (452 ± 5) нм и при (475 ± 5) нм (раздел «Количественное определение. *Зеаксантин, Лютеин*»).

*Флуориметрия.* Должна наблюдаться флюоресценция при длине волны регистрации 520 нм (длина волны возбуждения 366 нм) (раздел «Количественное определение. Селен»).

*Атомно-абсорбционная спектрометрия.* Величина абсорбции испытуемых растворов, описанных в соответствующих разделах испытания «Количественное определение» должна быть одного порядка для:

* *меди* при длине волны 324,8 нм и калибровочного раствора меди с концентрацией 5,0 мкг/мл;
* *цинка* при длине волны 213,8 нм и калибровочного раствора цинка с концентрацией 2,0 мкг/мл.

*Качественная реакция. Аскорбиновая кислота.* Навеску порошка растертых таблеток, эквивалентную около 100 мг аскорбиновой кислоты, взбалтывают с 20 мл воды и филь­труют через бумажный фильтр с размером пор 13-25 мкм. К 2 мл фильтрата прибавля­ют 5 мл фосфорномолибденовой кислоты раствора 4 %; должно появиться синее окрашивание.

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

**Распадаемость.** Не более мин 45 мин, с дисками (ОФС «Распадаемость таблеток и капсул»). Среда проведения испытания – вода.

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

**Количественное определение**

*Ретинола ацетат,**α-токоферола ацетат*

Определение проводят методом ВЭЖХ в соответствии с требованиями ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография».

*Подвижная фаза.* Метанол.

*Испытуемый раствор.* Точную навеску порошка растертых таблеток, эквивалентную около 0,51 мг *ретинола ацетата* (соответствует 1476,76 МЕ) и 7,62 мг *α-токоферола ацетата*, помещают в коническую колбу вместимо­стью 100 мл, прибавляют 5 мл хлористоводородной кислоты раствора 0,1 М, 2 мл спирта 96 % и нагревают на водяной бане при температуре 60 - 65 °С при перемешивании в течение 3 мин. Содержимое колбы охлаждают под струей холодной воды до температуры 15 - 25 ºС, количественно переносят с помощью 10 мл спирта 96 % в делительную воронку и экстрагируют 15 мл гексана в течение 3 мин. Экстракцию повторяют дважды 15 мл гексана. Гексановые фракции объединяют и фильтруют через слой ваты с 3 г натрия сульфата безводного в круглодонную колбу вмести­мостью 100 мл. Вату с натрия сульфатом промывают 10 мл гексана, присо­единяя фильтрат в ту же круглодонную колбу. Гексан отгоняют под вакуу­мом на роторном испарителе при температуре бани не выше 40 °С. Сухой остаток количественно, с помощью метанола, переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора метанолом до метки, переме­шивают и фильтруют через нейлоновый мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм.

*Раствор стандартного образца ретинола ацетата.* В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают точную навеску стандартного образца ретинола ацетата, эквивалентную 80000 ME (около 27,52 мг), растворяют в 15 мл 2-пропанола, доводят объем раствора 2-пропанолом до метки и перемешивают. Срок годности раствора – 7 суток при хранении в защищенном от света месте при температуре 2 - 8 °С. Раствор содержит около 0,55 мг/мл ретинола ацетата.

*Раствор стандартного образца* *α-токоферола ацетата*. В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают около 200 мг (точная навеска) стандартного образца α-токоферола ацетата, растворяют в 20 мл 2-пропанола, доводят объем раствора 2-пропанолом до метки и перемешивают. Срок годности раствора – 1 мес. при хранении в склянке с притертой пробкой при температуре 2 - 8 °С.

*Стандартный раствор*. В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 1,0 мл раствора стандартного образца ретинола ацетата, прибавляют 1,0 мл раствора стандартного образца α-токоферола ацетата, доводят объем раствора метанолом до метки и перемешивают. Срок годности раствора – 8 ч.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка  | 125 × 4,0 мм, силикагель октадецилсилильный эндкепированный для хроматографии, 5 мкм; |
| Температура колонки | 25 °С; |
| Скорость потока | 1,0 мл/мин; |
| Детектор | спектрофотометрический, 326 нм – для ретинола ацетата, 284 нм – для α-токоферола ацетата; |
| Объём пробы | 20 мкл; |
| Время хроматографирования | 15 мин. |

Время удерживания ретинола ацетата составляет около 2,2 мин, α-токоферола ацетата – около 4,0 мин.

Хроматографируют стандартный раствор и испытуемый раствор.

*Пригодность хроматографической системы.* На хроматограмме стандартного раствора:

* *разрешение (RS)* между пиками ретинола ацетата и α-токоферола ацетата должно быть не менее 3;
* *эффективность хроматографической колонки (N),* рассчитанная по пику α-токоферола ацетата должна быть не менее 2000 теоретических тарелок;
* *фактор асимметрии (As) пика*, рассчитанный для пиков ретинола ацетата и α-токоферола ацетата должен быть не более 2,0;
* *относительное стандартное отклонение* площадей пиков ретинола ацетата и α-токоферола ацетата должно быть не более 2,0 % (5 введений).

Содержание ретинола ацетата C22H32O2 в препарате в процентах от заявленного количества (*Х*) вычисляют по формуле:

$$X=\frac{S\_{1}∙a\_{0}·1·25·G∙P·}{S\_{0}∙a\_{1}·25·50·L}=\frac{S\_{1}∙a\_{0}∙G∙P}{S\_{0}∙a\_{1}·50·L}, $$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *S*1 | − | площадь пика ретинола ацетата на хроматограмме испытуемого раствора; |
|  | *S*0 | − | площадь пика ретинола ацетата на хроматограмме стандартного раствора; |
|  | *a1* | − | навеска порошка растертых таблеток, г; |
|  | *a*0 | − | навеска стандартного образца ретинола ацетата, мг; |
|  | *G* | − | средняя масса таблетки, г; |
|  | *P* | − | содержание основного вещества в стандартном образце ретинола ацетата, %; |
|  | *L* | – | заявленное количество ретинола ацетата в таблетке, мг. |

Содержание ретинола ацетата C22H32O2 в препарате в ME (*Y*) вычисляют по формуле:

$$Y=\frac{X∙L }{100∙0,000344}= \frac{X∙L}{0,0344},$$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *X* | − | содержание ретинола ацетата в препарате в процентах от заявленного количества, %; |
|  | *L* | − | заявленное количество ретинола ацетата в таблетке, мг; |
|  | *0,000344* | − | коэффициент пересчета МЕ ретинола ацетата в мг; |

Содержание α-токоферола ацетата С31Н52О3 в препарате в процентах от заявленного количества (*Х*) вычисляют по формуле:

$$X=\frac{S\_{1}∙a\_{0}·1·25·G∙P}{S\_{0}∙a\_{1}·25·25·L}=\frac{S\_{1}∙a\_{0}∙G∙P}{S\_{0}∙a\_{1}·25·L}, $$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *S*1 | − | площадь пика α-токоферола ацетата на хроматограмме испытуемого раствора; |
|  | *S*0 | − | площадь пика α-токоферола ацетата на хроматограмме стандартного раствора; |
|  | *a1* | − | навеска порошка растертых таблеток, г; |
|  | *a*0 | − | навеска стандартного образца α-токоферола ацетата, мг; |
|  | *G* | − | средняя масса таблетки, г; |
|  | *P* | − | содержание основного вещества в стандартном образце α-токоферола ацетата, %; |
|  | *L* | – | заявленное количество α-токоферола ацетата в таблетке, мг. |

*Пиридоксина гидрохлорид, тиамина гидрохлорид, рибофлавин, фолиевая кислота*

Определение проводят методом ВЭЖХ в соответствии с требованиями ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография».

*Подвижная фаза А (ПФА).* В мерную колбу вместимостью 500 мл помещают 0,53 г натрия гексилсульфоната, растворяют в 400 мл воды, прибавляют 5 мл уксусной кислоты ледя­ной и 0,25 мл триэтиламина, доводят объем раствора водой до метки, перемешивают и фильтруют через нейлоновый мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм. Срок годности – 7 суток при хранении в герметично укупоренной таре.

*Подвижная фаза Б (ПФБ).* ПФА смешивают с ацетонитрилом в объемном соот­ношении 3:2, фильтруют через нейлоновый мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм. Срок годности – 7 суток при хранении в герметично укупоренной таре.

*Подвижная фаза.* ПФБ—ПФА 25:75.

*Растворитель.* В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 12,8 г аммония ацетата, растворяют в 500 мл воды, прибавляют 50 мл ацетонитрила, 10 мл уксусной кислоты ледяной, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Срок годности – 7 суток при хранении в герметично укупоренной таре.

*Испытуемый раствор.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают точную навеску порошка растертых таблеток, эквивалентную около 5 мг пиридоксина гидрохлорида, 2 мг рибофлавина, 5 мг тиамина гидрохлорида, 400 мкг фолиевой кислоты. При постоянном взбалтывании прибавляют около 80 мл растворителя, встряхивают вручную в течение 5 мин, так, чтобы вся навеска была смочена, выдерживают на водяной бане при температуре 80 - 85 °С в течение 10 мин, встряхивая каждые 2 мин. Затем колбу выдерживают в ультразвуковой бане (мощностью не менее 100 Вт) в течение 15 мин, быстро охлаждают под струей холодной воды до температуры 15-25 ºС, доводят объем получен­ной суспензии растворителем до метки и перемешивают. Около 15 мл полученного раствора помещают в центрифужную пробирку и центрифугируют при скорости 8000 об/мин в течение 10 мин. Шприцем из середины надосадочной жидкости отбирают около 2 мл пробы и фильтруют через нейлоновый мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм.

*Раствор стандартного образца фолиевой кислоты.* В мерную колбу вместимостью 200 мл помещают около 40 мг (точная навеска) стандартного образца фолиевой кислоты, растворяют в смеси 50 мл воды и 2 мл аммиака раствора 5 М, доводят объем раствора водой до метки и пере­мешивают.

*Стандартный раствор.* В мерную колбу вместимостью 200 мл помещают около 50 мг (точная навеска) стандартного образца пиридоксина гидрохлорида, около 20 мг (точная навеска) стандартного образца рибофлавина и около 50 мг (точная навеска) стандартного образца тиамина гидрохлорида, прибавляют 80 мл уксус­ной кислоты раствора 1 % и выдерживают на водяной бане при температуре 85 - 90 °С при постоянном перемешивании до растворения навески, затем выдерживают 10 мин на ультразвуковой бане, быстро охлаждают, доводят объем раствора этим же растворителем до метки и перемешивают. В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают в качестве стабилиза­тора 50 мг аскорбиновой кислоты, 10,0 мл полученного раствора, 30 мл *растворителя*, перемешивают, за­тем прибавляют 1,0 мл раствора стандартного образца фолиевой кислоты, доводят объем раствора растворителем до метки, перемешивают и фильтруют через нейлоновый мембранный фильтр размером пор 0,45 мкм. Срок годности раствора – 8 ч.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка  | 150 × 4,6 мм, силикагель октадецилсилильный эндкепированный для хроматографии, 5 мкм; |
| Температура колонки | 25 °С; |
| Скорость потока | 1,0 мл/мин; |
| Детектор | спектрофотометрический,  265 нм – для рибофлавина, тиамина,  280 нм – для пиридоксина, фолиевой кислоты; |
| Объём пробы | 10 мкл; |
| Время хроматографирования | 17 мин. |

Время удерживания аскорбиновой кислоты составляет около 2 мин, пиридоксина – около 4,5 мин, фолиевой кислоты – около 6,0 мин; тиамина – около 10,0 мин; рибофлавина – около 13,0 мин.

Хроматографируют стандартный раствор и испытуемый раствор.

Во время хроматографирования испытуемого раствора, после выхода пика рибофлавина, колонку промывают в течение 10 мин ПФБ, для удаления из колонки рутина и затем уравновешивают колонку подвижной фазой до достижения стабильной базовой линии.

*Пригодность хроматографической системы.* На хроматограмме стандартного раствора:

* *разрешение (RS)* между соседними пиками всех компонентов должно быть не менее 2,0;
* *эффективность хроматографической колонки (N),* рассчитанная по пику пиридоксина должна быть не менее 4000 теоретических тарелок;
* *факторы асимметрии (As)* пиков пиридоксина, фолиевой кислоты, тиа­мина и рибофлавина должны быть не более 1,5;
* *относительное стандартное отклонение* площадей пиков всех компонентов должно быть не более 5,0 % (5 введений).

Содержание пиридоксина гидрохлорида C8H11NO3·HCl, рибофлавина C17H20N4O6, тиамина гидрохлорида C12H17ClN4OS·HCl в препарате в процентах от заявленного количества (*Х*) вычисляют по формуле:

$$X=\frac{S\_{1}∙a\_{0}·10·100·G∙P}{S\_{0}∙a\_{1}·50·200·L}= \frac{S\_{1}∙a\_{0}·G∙P}{S\_{0}∙a\_{1}·10·L}, $$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *S*1 | − | площадь пика пиридоксина гидрохлорида/ рибофлавина/ тиамина гидрохлорида на хроматограмме испытуемого раствора; |
|  | *S*0 | − | площадь пика пиридоксина гидрохлорида/ рибофлавина/ тиамина гидрохлорида на хроматограмме стандартного раствора; |
|  | *a1* | − | навеска порошка растертых таблеток, г; |
|  | *a*0 | − | навеска стандартного образца пиридоксина гидрохлорида/ рибофлавина/ тиамина гидрохлорида, мг; |
|  | *G* | − | средняя масса таблетки, г; |
|  | *P* | − | содержание основного вещества в стандартном образце пиридоксина гидрохлорида/ рибофлавина/ тиамина гидрохлорида, %; |
|  | *L* | – | заявленное количество пиридоксина гидрохлорида/ рибофлавина/ тиамина гидрохлорида в таблетке, мг. |

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

$$X=\frac{S\_{1}∙a\_{0}·1·100·G∙P·1000}{S\_{0}∙a\_{1}·50·200·L}= \frac{S\_{1}∙a\_{0}·G∙P·1000}{S\_{0}∙a\_{1}·100·L}, $$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *S*1 | − | площадь пика фолиевой кислоты на хроматограмме испытуемого раствора; |
|  | *S*0 | − | площадь пика фолиевой кислоты на хроматограмме стандартного раствора; |
|  | *a1* | − | навеска порошка растертых таблеток, г; |
|  | *a*0 | − | навеска стандартного образца фолиевой кислоты, мг; |
|  | *G* | − | средняя масса таблетки, г; |
|  | *P* | − | содержание основного вещества в стандартном образце фолиевой кислоты, %; |
|  | *L* | – | заявленное количество фолиевой кислоты в таблетке, мкг; |
|  | *1000* | – | перевод мг в мкг. |

*Рутозида тригидрат*

Определение проводят методом ВЭЖХ в соответствии с требованиями ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография».

Подвижная фаза. В мерную колбу вместимо­стью 200 мл помещают 120 мл воды, прибавляют 70 мл метанола, 2 мл уксусной кислоты ледяной, доводят объем раствора водой до метки, перемешивают, фильтруют через нейлоновый мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм. Срок годности раствора – 1 мес. при хранении при температуре 2-8 °С.

Растворитель. 30 мл воды смешивают с 70 мл метанола.

Испытуемый раствор. В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают точную навеску порошка растертых таблеток, эквивалентную около 25,00 мг рутозида безводного (или 27,21 мг рутозида тригидрата), прибавляют 30 мл метанола и выдерживают на ультразвуковой бане в течение 10 мин. Содержимое колбы быстро охлаждают под струей холодной воды до температуры 15-25 ºС, доводят объем полученной суспен­зии метанолом до метки, перемешивают, помещают содержимое в центрифужную пробирку и центрифугируют в течение 10 мин при скорости 9000 об/мин. В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 4,0 мл надосадочной жидкости, доводят объем раствора растворителем до метки, перемешивают и фильтруют через нейлоновый мем­бранный фильтр с размером пор 0,45 мкм.

Раствор стандартного образца рутозида тригидрата 0,08 мг/мл. Около 50 мг (точная навеска) стандартного образца рутозида тригидрата помеща­ют в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 30 мл метанола, вы­держивают на ультразвуковой бане в течение 10 мин, доводят объем раство­ра метанолом до метки и перемешивают. 2,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора растворителем до метки, перемешивают и фильтруют через нейлоновый мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм. Срок годности раствора – 8 ч.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка  | 150 × 4,6 мм, силикагель октадецилсилильный эндкепированный для хроматографии, 5 мкм; |
| Температура колонки | 25 °С; |
| Скорость потока | 0,85 мл/мин; |
| Детектор | спектрофотометрический, 360 нм;  |
| Объём пробы | 20 мкл; |
| Время хроматографирования | 15 мин. |

Время удерживания пика рутозида составляет около 6 мин.

Хроматографируют раствор стандартного образца рутозида тригидрата и испытуемый раствор.

*Пригодность хроматографической системы.* На хроматограмме раствора стандартного образца рутозида тригидрата:

* *эффективность хроматографической колонки (N),* рассчитанная по пику рутозида должна быть не менее 2000 теоретических тарелок;
* *фактор асимметрии (As)* пика рутозида должен быть не более 2,0;
* *относительное стандартное отклонение* площади пика рутозида должно быть не более 2,0 % (5 введений).

Содержание рутозида безводногоC27 H30 O16 в препарате в процентах от заявленного количества (*Х*) вычисляют по формуле:

$$X=\frac{S\_{1}∙a\_{0}·2·25·50·G∙P}{S\_{0}∙a\_{1}·4·25·50·L}= \frac{S\_{1}∙a\_{0}·G∙P}{S\_{0}∙a\_{1}·2·L}, $$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *S*1 | − | площадь пика рутозида на хроматограмме испытуемого раствора; |
|  | *S*0 | − | площадь пика рутозида на хроматограмме раствора стандартного образца рутозида тригидрата; |
|  | *a1* | − | навеска порошка растертых таблеток, г; |
|  | *a*0 | − | навеска стандартного образца рутозида тригидрата, мг; |
|  | *G* | − | средняя масса таблетки, г; |
|  | *P* | − | содержание основного вещества рутозида безводного в стандартном образце рутозида тригидрата, %; |
|  | *L* | – | заявленное количество рутозида безводного в таблетке, мг. |
|  |  |  |  |

*Цианокобаламин*

Определение проводят методом ВЭЖХ в соответствии с требованиями ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография».

Все операции с препаратом и стандартным образцом следует проводить в условиях максимальной защиты от света, используя посуду темного стекла.

*Фосфатный буферный раствор pH 3,0.* 2 г калия дигидрофосфосфата помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, растворяют в 800 мл воды, доводят pH раствора фосфорной кислотой потенциометрически до 3,0 ± 0,05. Затем доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Срок годности раствора – 7 суток.

*Подвижная фаза.* Метанол—Фосфатный буферный раствор pH 3,0 1:3. Фильтруют через нейлоновый мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм.

Срок годности раствора – 15 суток при хранении в герметично укупоренной таре при температуре 15-25 ºС.

*Натрия эдетата раствор 10 %.* 10 г натрия эдетата дигидрата помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 70 мл воды и растворяют при нагревании на водяной бане при температуре 50 - 60 °С, периодически встряхивая, охлаждают до температуры 15-25 ºС, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Срок годности раствора – 1 мес.

*Испытуемый раствор*. В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают точную навеску порошка растертых таблеток, эквивалентную 12 мкг цианокобаламина и медленно, при осторожном непрерывном перемешивании, прибавляют 3 раза по 5 мл натрия эдетата раствора 10 %, так, чтобы вся навеска была смочена. Выдерживают колбу с содержимым на ультразвуковой бане (мощностью не менее 100 Вт) в течение 10 мин, в защищенном от света месте при температуре 25 ± 5 °С. Затем доводят объём раствора натрия эдетата раствором 10 % до метки, перемешивают, помещают содержимое в центрифужную пробирку вместимостью 15 мл и центрифугируют в течение 15 мин при скорости 8000 об/мин. Осторожно, из середины надосадочной жидкости, шприцем, отбирают около 2 мл пробы, фильтруют через нейлоновый мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм и немедленно хроматографируют.

*Раствор стандартного образца цианокобаламина.* Около 25 мг (точная навеска) стандартного образца цианокобаламина помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 80 мл воды, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. 1,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. 5,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора натрия эдетата раствором 10 % до метки и перемешивают. Срок годности раствора – 8 ч.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка  | 150 × 4,6 мм, силикагель октадецилсилильный эндкепированный для хроматографии, 5 мкм; |
| Температура колонки | 25 °С; |
| Скорость потока | 0,75 мл/мин; |
| Детектор | спектрофотометрический, 550 нм;  |
| Объём пробы | 100 мкл; |
| Время хроматографирования | 10 мин. |

Время удерживания пика цианокобаламина составляет около 5,5 мин.

Хроматографируют раствор стандартного образца цианокобаламина и испытуемый раствор.

*Пригодность хроматографической системы.* На хроматограмме раствора стандартного образца цианокобаламина:

* *эффективность хроматографической колонки (N),* рассчитанная по пику цианокобаламина должна быть не менее 1000 теоретических тарелок;
* *фактор асимметрии (As)* пика цианокобаламина должен быть не более 2,0;
* *относительное стандартное отклонение* площади пика цианокобаламина должно быть не более 5,0 % (5 введений);
* *соотношение сигнал/шум (S/N)* для пика цианокобаламина должно оставлять не менее 15.

Содержание цианокобаламинаC63H88CoN14O14P в препарате в процентах от заявленного количества (*Х*) вычисляют по формуле:

$$X=\frac{S\_{1}∙a\_{0}·1·5·25·G∙P}{S\_{0}∙a\_{1}·25·100·100·L}= \frac{S\_{1}∙a\_{0}·G∙P}{S\_{0}∙a\_{1}·2000·L}, $$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *S*1 | − | площадь пика цианокобаламина на хроматограмме испытуемого раствора; |
|  | *S*0 | − | площадь пика цианокобаламина на хроматограмме раствора стандартного образца; |
|  | *a1* | − | навеска порошка растертых таблеток, г; |
|  | *a*0 | − | навеска стандартного образца цианокобаламина, мг; |
|  | *G* | − | средняя масса таблетки, г; |
|  | *P* | − | содержание основного вещества в стандартном образце цианокобаламина, %; |
|  | *L* | – | заявленное количество цианокобаламина в таблетке, мг. |

*Зеаксантин, лютеин*

Определение проводят методом спектрофотометрии в соответствии с ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях». Все операции с препаратом следует проводить в условиях максимальной защиты от света, используя посуду темного стекла.

*Испытуемый раствор.* В коническую колбу вместимостью 100 мл помещают точную навеску порошка растертых таблеток, эквивалентную около 2,5 мг лютеина, 1,00 мг зеаксантина, прибавляют 25 мл аммиака раствора 10 %, 15 мл спирта 96 % и нагревают на водяной бане при температуре (60 - 65) °С, при перемешивании в течение 10 мин. Охлаждают под струей холодной воды до температуры 15 – 25 ºС, прибавляют 25 мл смеси: гексан - этилацетат (1:2), выдерживают на ультразвуковой бане (мощностью не менее 100 Вт) в течение 20 мин, при температуре (25 ± 5) °С и затем встряхивают в течение 15 мин.

Содержимое колбы количественно переносят с помощью смеси: гексан

- этилацетат (1:2) в делительную воронку вместимостью 100 мл и оставляют до полного разделения слоев. Нижний слой отбрасывают. Верхний органический слой фильтруют через бумажный фильтр с размером пор 13-25 мкм, на который помещено около 3 г натрия сульфата безводного в мерную колбу вместимостью 100 мл. Фильтр промывают смесью: гексан - этилацетат (1:2), объединяя смывы с фильтратом в мерной колбе, доводят объем раствора смесью: гексан - этилацетат (1:2) до метки и перемешивают.

1,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора смесью: этанол - гексан (1:3) до метки и перемешивают.

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

Содержание суммы зеаксантина и лютеинав пересчете на лютеин в препарате в процентах от заявленного количества (*Х*) вычисляют по формуле:

$X=\frac{A ∙1000∙ 25 ∙ 100 ∙ G ∙ 100}{А\_{1см}^{1\%}∙ a ∙ 1 ∙ 100 ∙ L}= \frac{A ∙ 25000 ∙ G ∙ 100}{А\_{1см}^{1\%}∙ a ∙ L}$,

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *A* | – | оптическая плотность испытуемого раствора; |
|  | $$А\_{1см}^{1\%}$$ | − | удельный показатель поглощения лютеина в смеси этанол-гексан (1:3) при длине волны 452 нм, равный 2550; |
|  | *а* | − | навеска порошка растертых таблеток, г; |
|  | *G* | − | средняя масса таблетки, г; |
|  | *L* | − | заявленное количество зеаксантина и лютеина суммарно в таблетке, мг. |

*Селен*

Определение проводят методом флуориметрии в соответствии с ОФС «Флуориметрия».

*2,3-Диаминонафталина раствор 0,1% очищенный.* 2,3-Диаминонафталина раствор 0,1 % помещают в делительную воронку вместимостью 500 мл, прибавляют 15 мл гексана и встряхивают в течение 2 мин. После расслаивания жидкостей, слои разделяют. Верхний гексановый слой отбрасывают, а нижний слой фильтруют через бумажный фильтр с размером пор 13-25 мкм. Раствор используют свежеприготовленным.

*Натрия эдетата раствор 2 %.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 2,0 г натрия эдетата дигидрата, прибавляют 70 мл воды и растворяют, при нагревании на водяной бане, при температуре (50 - 60) °С, периодически встряхивая, охлаждают до температуры 15 – 25 °С, доводят объем раствора водой до метки, перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр с размером пор 13-25 мкм. Срок годности раствора – 6 мес.

*Испытуемый раствор.* Точную навеску порошка растертых таблеток, эквивалентную около 9,5 мкг селена, помещают в высокий стакан из термостойкого стекла вместимостью 100 мл, прибавляют 5 мл азотной кислоты концентрированной, помещают стакан, на электроплитку и выпаривают содержимое (приблизительно до объема раствора около 2 мл - по предварительно нанесенной метке на стакане), следя, чтобы в конце выпаривания проба оставалась смоченной. Стакан снимают с плитки, ставят на асбестовую сетку, осторожно встряхивают для удаления бурых паров и охлаждают до температуры 15-25 ºС. Затем, содержимое стакана количественно, с помощью воды, переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объём раствора водой до метки и перемешивают. 4,0 мл полученного опалесцирующего раствора помещают в высокий стакан из термостойкого стекла вместимостью 100 мл, прибавляют 3 мл хлорной кислоты и выпаривают до начала появления «густых» белых паров хлорной кислоты (примерно до 3 мл - по метке на стакане). Стакан снимают с плитки, ставят на асбестовую сетку, выдерживают в течение 1 мин, прибавляют 2 мл воды, осторожно обмывая водой стенки стакана, повторно нагревают до начала появления «густых» белых паров и снимают с плитки.

*Раствор стандартного образца селена (2 мкг/мл).* В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 5,0 мл стандартного образца селена (IV) с аттестованным содержанием селена 1000 мг/л, доводят объем раствора хлористоводородной кислоты раствором 0,1 М до метки и перемешивают. В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 1,0 мл полученного раствора, доводят объём раствора хлористоводородной кислоты раствором 0,1 М до метки и перемешивают. Срок годности раствора – 8 ч.

Параллельно проводят подготовку контрольного раствора и раствора стандартного образца селена. Для этого в два высоких стакана из термостойкого стекла вместимостью 100 мл прибавляют: в первый – 10 мл воды, во второй – 5 мл воды и 5,0 мл раствора стандартного образца селена. Затем в оба стакана прибавляют по 5 мл азотной кислоты концентрированной, 3 мл хлорной кислоты и выпаривают содержимое на плитке до начала появления белых «густых» паров хлорной кислоты (примерно до 3 мл – по метке на стаканах). Стаканы снимают с плитки, выдерживают в течение 1 мин, в каждый стакан прибавляют по 2 мл воды, осторожно обмывая водой стенки стаканов и вновь выпаривают до появления белых «густых» паров, после чего стаканы снимают с плитки и оставляют до охлаждения раствора до температуры 15-25 ºС.

После охлаждения, содержимое стаканов количественно, с помощью воды, переносят в мерные колбы вместимостью 50 мл, доводят объемы растворов водой до метки и перемешивают. По 4,0 мл контрольного раствора и раствора стандартного образца селена помещают в стаканы из термостойкого стекла вместимостью 100 мл и используют для дальнейшего проведения анализа.

В стаканы с испытуемым раствором, контрольным раствором и раствором стандартного образца селена прибавляют по 2 мл хлористоводородной кислоты концентрированной и нагревают на водяной бане в течение 10 мин. Растворы охлаждают до температуры 15-25 ºС, поместив стаканы в баню с холодной водой. После охлаждения, к каждому раствору прибавляют по 20 мл воды, обмывая водой стенки стакана и потенциометрически доводят pH растворов до 1,0 ± 0,05 с помощью аммиака раствора 10 %. Затем прибавляют по 4 мл натрия эдетата раствора 2 %, выдерживают в течение 5 мин, прибавляют по 4 мл 2,3-диаминонафталина раствора 0,1 % очищенного, перемешивают и нагревают на водяной бане в течение 5 мин. После охлаждения в бане с холодной водой, растворы переносят в делительные воронки вместимостью 100 мл, прибавляют по 8 мл гексана, встряхивают содержимое в течение 1 мин и дают отстояться до разделения фаз. Водную фазу отбрасывают, а органическую фазу фильтруют через сухой бумажный фильтр с размером пор 8-15 мкм в градуированные пробирки с притертой пробкой вместимостью 10 мл, доводят объемы растворов до метки гексаном, перемешивают.

Интенсивность флуоресценции полученных растворов измеряют на флуориметре (длина волны возбуждения – 366 нм, длина волны регистрации –520 нм), используя в качестве раствора сравнения контрольный раствор.

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

*Х =*$ \frac{I\_{1}∙V∙1 ∙4∙5∙10∙50∙G∙100∙1000}{I\_{0}∙a∙4∙10∙50∙50∙50∙L}=\frac{I\_{1}∙V∙G∙200}{I\_{0}∙a∙L}$*,*

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *I1* | – | интенсивность флюоресценции испытуемого раствора; |
|  | *I0* | − | интенсивность флюоресценции раствора стандартного образца селена; |
|  | *а* | − | навеска порошка растертых таблеток, г; |
|  | *V* | − | аликвота стандартного образца селена с концентрацией 1000 мг/л, мл (5 мл); |
|  | *G* | − | средняя масса таблетки, г; |
|  | *L* | − | заявленное количество селена в таблетке, мкг; |
|  | *1000* | − | пересчет мг в мкг. |
|  |  |  |  |

*Медь*

Определение проводят методом атомно-абсорбционной спектрометрии, в соответствии с требованиями ОФС «Атомно-абсорбционная спектрометрия».

*Хлористоводородной кислоты раствор 0,4 М*. 4 г хлористоводородной кислоты концентрированной приливают к 90 мл воды и доводят тем же растворителем до 100,0 мл.

*Испытуемый раствор 4,8 мкг/мл.* В мерную колбу вместимостью 250 мл помещают точную навеску порошка растертых таблеток, эквивалентную около 2 мг меди, прибавляют 50 мл воды, 15 мл хлористоводородной кислоты концен­трированной, перемешивают в течение 20 мин, доводят объем раствора во­дой до метки, перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр с размером пор 13-25 мкм, отбрасывая первые 10 мл фильтрата. 15,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

*Контрольный раствор.* Хлористоводородной кислоты раствор 0,4 М.

*Раствор стандартного образца меди 100 мкг/мл.* В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 5,0 мл стандартного раствора меди с аттестованным значением меди 1000 мг/л, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Срок годности раствора – 6 мес. при хранении в плотно укупоренной упаковке из полимерных материалов.

*Калибровочные растворы.* В мерные колбы вместимостью 50 мл помещают стандартный раствор меди 100 мкг/млв количестве 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают (получают растворы с содержанием цинка 3; 4; 5; 6; 7 мкг/мл соответственно).

*Условия испытания*

|  |  |
| --- | --- |
| Источник излучения | Спектральная лампа с полым катодом для определения меди; |
| Атомизация | воздушно-ацетиленовое пламя; |
| Расход газа | воздух – 500 л/ч,ацетилен – 80 л/ч; |
| Длина волны | 324,8 нм. |

Последовательно измеряют поглощение контрольного, калибровочных растворов и испытуемого раствора.

Для каждого раствора проводят не менее 3 измерений. Строят калибровочную кривую зависимости средних результатов измерений, полученных для калибровочных растворов от их концентрации. Содержание медив испытуемом растворе определяют по калибровочному графику.

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

*X* = $\frac{С ∙ 25 ∙ 250 ∙G ∙ 100 }{a∙ 15 ∙L∙ 1000 }$ = $\frac{С ∙ 1250 ∙G ∙ 100 }{a∙ 3 ∙L∙ 10}$,

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *С* | – | содержание меди в испытуемом растворе, определенное по калибровочному графику, мкг/мл; |
|  | *а* | − | навеска порошка таблеток, г; |
|  | *G* | − | средняя масса таблетки, г; |
|  | *L* | − |  заявленное содержание меди в таблетке, мг; |
|  | *1000* | − | пересчет из мг в мкг. |

*Цинк*

Определение проводят методом атомно-абсорбционной спектрометрии, в соответствии с требованиями ОФС «Атомно-абсорбционная спектрометрия».

*Испытуемый раствор 2 мкг/мл.* В мерную колбу вместимостью 250 мл помещают точную навеску порошка растертых таблеток, эквивалентную около 10 мг цинка, прибавляют 50 мл воды, 15 мл хлористоводородной кислоты концен­трированной, перемешивают в течение 20 мин, доводят объем раствора во­дой до метки, перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр с 13-25 мкм, отбрасывая первые 10 мл фильтрата. 5,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, до­водят объем раствора водой до метки и перемешивают.

*Контрольный раствор*. Хлористоводородной кислоты раствор 0,025 М.

*Раствор стандартного образца цинка 100 мкг/мл.* 5,0 стандартного раствора цинка с аттестованным значением цинка 1000 мг/л помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Срок годности раствора – 6 мес. при хранении в плотно укупоренной упаковке из полимерных материалов.

*Калибровочные растворы.* В мерные колбы вместимостью 50 мл помещают стандартный раствор цинка 100 мкг/млв количестве 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают (получают растворы с содержанием цинка 1; 2; 3; 4; 5 мкг/мл соответственно).

*Условия испытания*

|  |  |
| --- | --- |
| Источник излучения | Спектральная лампа с полым катодом для определения цинка; |
| Атомизация | воздушно-ацетиленовое пламя; |
| Расход газа | воздух – 500 л/ч,ацетилен – 80 л/ч; |
| Длина волны | 213,8 нм. |

Последовательно измеряют поглощение контрольного, калибровочных и испытуемого растворов.

Для каждого раствора проводят не менее 3 измерений. Строят калибровочную кривую зависимости средних результатов измерений, полученных для калибровочных растворов от их концентрации. Содержание цинкав испытуемом растворе определяют по калибровочному графику.

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

*X* = $\frac{С ∙ 100 ∙ 250 ∙G ∙ 100 }{a∙ 5 ∙L∙ 1000 }$ = $\frac{С ∙G ∙100 }{a ∙L }$,

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *С* | – | содержание цинка в испытуемом растворе, определенное по калибровочному графику, мкг/мл; |
|  | *а* | − | навеска порошка растертых таблеток, г; |
|  | *G* | − | средняя масса таблетки, г; |
|  | *L* | − |  заявленное содержание цинка в таблетке, мг; |
|  | *1000* | − | пересчет из мг в мкг. |

*Аскорбиновая кислота*

Определение проводят методом титриметрии.

*Щавелевой кислоты раствор 2 %.* 2,0 г щавелевой кислоты дигидрата растворяют в воде и доводят объём раствора водой до 100 мл. Срок годности раствора – 1 мес.

*0,00167 М раствор калия йодата.* В мерную колбу вместимостью 500 мл помещают 50 мл 0,0167 М раствора калия йодата, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Раствор годен в течение 8 ч.

*Установка титра.* 10 мл приготовленного 0,00167 М раствора калия йодата помещают в коническую колбу с притертой пробкой, прибавляют 50 мл воды, 5 мл 9,8 % разведенной серной кислоты, 0,4 г калия йодида и оставляют на 10 мин в защищенном от света месте. Выделившийся йод титруют 0,005 М раствором натрия тиосульфата, используя в качестве индикатора 1 мл крахмала раствора 0,1 %. Индикатор прибавляют в конце титрования.

1 мл 0,005 М раствора натрия тиосульфата соответствует 0,1783 мг калия йодата.

*Испытуемый раствор.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают точную навеску порошка растертых таблеток, эквивалентную около 100,6 мг аскорбиновой кислоты, прибавляют 30 мл щавелевой кислоты раствора 2 %, взбалтывают, доводят объем раствора этим же растворителем до метки, перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр с размером пор 13-25 мкм, отбрасывая первые 10 мл фильтрата.

Далее определение проводят в соответствии с ОФС «Методы количественного определения витаминов», раздел «Определение водорастворимых витаминов», подраздел «5. Титриметрическое определение витамина С», начиная со слов «... 10 мл полученного раствора помещают в коническую колбу вместимостью 100 мл...» и заканчивая словами «...воду до общего объема 20 мл». Титруют 0,00167 М раствором калия йодата до появления стойкого сине-зеленого окрашивания. Параллельно проводят контрольный опыт.

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

*Х =*$ \frac{(V\_{1}-V\_{0}) ∙K ∙ 0,8824 ∙ 100 ∙ G ∙ 100}{a ∙ 10 ∙ L}$*=*$\frac{(V\_{1}-V\_{0}) ∙ K ∙ 8,824 ∙ 10 ∙G ∙100}{a ∙ L}$*,*

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *V*1 | – | объем титранта, израсходованный на титрование испытуемого раствора, мл; |
|  | *V*0 | − | объем титранта, израсходованный на титрование контрольного опыта, мл; |
|  | *K* | −  | поправочный коэффициент к титру 0,00167 М раствора калия йодата; |
|  | *а* | − | навеска порошка растертых таблеток, г; |
|  | *G* | − | средняя масса таблетки, г; |
|  | *L* | − | заявленное количество аскорбиновой кислоты в таблетке, мг; |
|  | *0,8824* | − | количество аскорбиновой кислоты, соответствующее 1 мл 0,00167 М раствора калия йодата, мг. |

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