**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |  |
| --- | --- |
| **Аскорбиновая кислота + Биотин + Кальция пантотенат + Колекальциферол + Никотинамид + Пиридоксина гидрохлорид + Ретинола пальмитат + Рибофлавин + Тиамина нитрат + альфа-Токоферол ацетат + Фолиевая кислота + Цианокобаламин + Железо + Кальций + Магний + Марганец + Медь + Молибден + Фосфор + Цинк, таблетки*****Acidum ascorbicum + Biotinum + Calcium pantotenas + Colecalciferolum + Nicotinamidum + Pyridocxini hydrochloridum + Retinoli palmitas+ Riboflavinum + Thiamini nitras + a-Tocopheryli acetas + Acidum folicum + Cyanocobalaminum + Ferrum + Calcium + Magnesium + Manganum + Cuprum + Molibdenum + Zincum + Phosphorus, tabulettae***  |  **ФС**  **Вводится впервые** |

 Настоящая фармакопейная статья распространяется на лекарственный препарат Аскорбиновая кислота + Биотин + Кальция пантотенат + Колекальциферол + Никотинамид + Пиридоксина гидрохлорид + Ретинола пальмитат + Рибофлавин + Тиамина нитрат + альфа-Токоферол ацетат + Фолиевая кислота + Цианокобаламин + Железо + Кальций + Магний + Марганец + Медь + Молибден + Цинк + Фосфор, 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 120 %;

̶ биотин С10 Н16N2O3S не менее 85 % и не более 130 %;

̶ кальция пантотената C18H32CaN2O10 не менее 90 % и не более 145 %;

̶ колекальциферола C27H44O не менее 80 % и не более 140 %;

̶ никотинамида С6Н6N2O не менее 90 % и не более 115 %;

̶ пиридоксина гидрохлорида C8H11NO3·HCI не менее 90 % и не более 120 %;

 ̶ ретинола пальмитат С36Н60О2 не менее 90 % и не более 145 %;

̶ рибофлавина C17H20N4O6 не менее 90 % и не более 120 %;

̶ тиамина нитрата C12H17N4OSˑNO3  не менее 90 % и не более 130 %;

̶ альфа-токоферола ацетата С31Н52О3 не менее 90 % и не более 120 %;

̶ фолиевой кислоты C₁₉H₁₉N₇O₆ не менее 85 % и не более 140 %;

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

̶ кальция в форме кальция фосфата Ca3(PO4)2 и кальция пантотената C18H32CaN2O10 не менее 90 % и не более 150 %;

̶ железа в форме железа сульфата FeSO4 не менее 90 % и не более 110 %;

̶ магния в форме магния оксида MgO и магния стеарата MgC36H70O4 не менее 90 % и не более 150 %;

̶ меди в форме меди сульфата CuSO4 не менее 80 % и не более 120 %;

̶ цинка в форме цинк сульфата моногидрата ZnSO4 · H2O не менее 80 % и не более 120 %;

̶ молибдена в форме натрия молибдата дигидрата Na2MoO4 ·2H2O не менее 80 % и не более 120 %;

̶ марганца в форме марганца сульфата моногидрата MnSO4·H2O менее 80 % и не более 120 % ;

̶ фосфор в форме кальция фосфата Ca3(PO4)2 не менее 90 % и не более 110 %;

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 пальмитат,* колекальциферола, а-токоферола ацетата, т*иамина нитрата, пиридоксина гидрохлорида, никотинамида, кальция пантотената, фолиевой кислоты* должно соответствовать времени удерживания пика соответствующего компонента на хроматограмме раствора стандартного образца.

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

*ТСХ пластинка* со слоем силикагеля 60 F254 и с толщиной слоя 200 мкм,

*Подвижная фаза (ПФ*). Вода⎯уксусная кислота ледяная⎯метанол⎯этилацетат 10:10:20:60.

Фосфорномолибденовой кислоты раствор 3,5 %. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 3,5 г фосфорномолибденовой кислоты, доводят объем раствора изопропропиловым спиртом до метки и перемешивают.

Метанола раствор 90 %. Вмерную колбу вместимостью 100 мл помещают 90 мл метанола, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

*Испытуемый раствор.*  Точную навеску порошка растёртых таблеток, эквивалентную по содержанию 50,0 мг аскорбиновой кислоты, переносят в мерную колбу вместимостью 20 мл, прибавляют 15 мл метанола раствора 90 %, обрабатывают ультразвуком в течение 10 мин и охлаждают до температуры 20-25 °С. Доводят объем раствора в колбе тем же растворителем до метки, перемешивают и центрифугируют в течение 5 мин при 4000 об/мин.

*Раствор стандартного образца аскорбиновой кислоты.* Около 50,0 мг (точная навеска) аскорбиновой кислоты стандартного образца помещают в мерную колбу вместимостью 20 мл, растворяют в метаноле растворе 90%, и доводят объем раствора в колбе тем же растворителем до метки, перемешивают.

На линию старта, проведенную на расстоянии 15-20 мм от нижнего края хроматографической пластинки, наносят по 5 мкл испытуемого раствора, раствора стандартного образца аскорбиновой кислоты на расстоянии не менее 10 мм, при необходимости высушивая место нанесения между нанесениями.

Пластинку с нанесенными пробами сушат в потоке воздуха в течение 15 мин, помещают в камеру со смесью растворителей, хроматографируют восходящим способом и обрабатывают фосфорномолибденовой кислоты раствором 3,5 % до появления синих пятен на желтом фоне. Длина пробега фронта растворителя должна составлять не менее 2/3 высоты пластинки.

Rf аскорбиновой кислоты около 0,6.

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

Спектрофотометрия.УФ - спектр испытуемого раствора должен иметь максимум поглощения при той же длине волны, что и УФ - спектр стандартного раствора по разделу «Количественное определение. *Фосфор*» в соответствии с ОФС «Спектрофотомерия в ультрафиолетовой и видимой областях». Должно наблюдаться голубое окрашивание испытуемого раствора.

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

*Масс- спектрометрия с индуктивно - связанной плазмой (ИСП-МС)* по разделу «Количественное определение. *Железо, Кальций, Магний, Марганец, Медь, Молибден, Фосфор, Цинк*» в соответствии с ОФС «Масс-спектрометрия». Поглощение испытуемого раствора должно быть идентично поглощению стандартного раствора.

Идентифицируют по массе изотопа

Кальций: 44

Магний: 24

Железо: 56

Марганец: 55

Фосфор: 31

Медь: 63

Цинк: 66

Молибден: 95

*Флуориметрия* по разделу (Количественное определение. Рибофлавин» в соответствии ОФС «Флуориметрия». *Эмиссия испытуемого раствора должна соответствовать эмиссии раствора стандартного образца.*

*Микробиологический метод*. Активность испытуемого раствора к тест-культуре должна соответствовать активности стандартного раствора к тест-культуре. Определение проводят в соответствии ОФС «Определение содержания витаминов в многокомпонентных лекарственных препаратах микробиологическим методом. Биотин, (пробирочный метод), Цианокобаламин», метод 1 (чашечный метод).

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

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

**Распадаемость.** Не более 60 мин. Определение проводят в соответствии с ОФС «Распадаемость таблеток и капсул» с использованием дисков.

**Количественное определение**

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

⃰При проведении одновременного определения ретинола пальмитата и альфа-токоферола ацетата необходимо испытуемый и стандартный растворы защищать от света и использовать лабораторную посуду из нейтрального стекла. Определение следует проводить немедленно после приготовления испытуемого и стандартного растворов при неярком искусственном освещении.

*Подвижная фаза.* Диоксан⎯Вода⎯Метанол⎯Ацетонитрил 40:55:300:700.

*Испытуемый раствор*. Точную навеску измельченного порошка таблеток, эквивалентную по содержанию 4,5 мг ретинола пальмитата, 45,5 мг альфа-токоферола ацетата, помещают в мерную колбу вместимостью 500 мл, прибавляют 5 мл хлористоводородной кислоты раствора 0,1 М, 40 мл хлористоводородной кислоты раствора 0,01 М, 25 мг пепсина и 25 мг трипсина. Нагревают при температуре около 55 °С в течение 15 мин, встряхивая время от времени, и обрабатывают ультразвуком в течение 5 мин. Затем прибавляют 400 мл спирта 96 % и охлаждают до температуры 15-25 °С. Обрабатывают ультразвуком в течение 3 мин, доводят объем раствора до метки спиртом 96 % и перемешивают.

В мерную колбу вместимостью 50 мл переносят 25 мл полученного раствора, доводят объем раствора спиртом 96 %до метки и перемешивают. Полученный раствор фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм (раствор для введения).

*Раствор стандартного образца альфа-токоферола ацетата.* Около 100,0 мг (точная навеска) альфа-токоферола ацетата стандартного образца помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в спирте 96 %, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают (раствор 1).

*Раствор стандартного образца ретинола пальмитата*. Около 110,0 мг (точная навеска) ретинола пальмитата стандартного образца помещают в мерную колбу вместимостью 250 мл, растворяют в спирте 96 %, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают (раствор2*).*

В мерную колбу вместимостью 200 мл помещают 10,0 мл раствора 1 и 5,0 мл раствора 2 и доводят объем раствора спиртом 96 % до метки, при необходимости фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм (раствор для введения).

Хроматографические условия.

|  |  |
| --- | --- |
| Предколонка: | 30 х 4,6 мм, силикагель октилсилильный эндкипированный для хроматографии , 10 мкм  |
|  | между насосом и системой введения пробы; |
| Колонка: | 250 х 4,0 мм, силикагель октилсилильный эндкипированный для хроматографии, 3 мкм; |
| Температура колонки:  | 10 °С ;  |
| Температура системы | 5 °С; |
| Детектор: | УФ, 326 нм для ретинола пальмитата; УФ, 284 нм для альфа токоферола ацетата; |
| Объем пробы: | 10 мкл; |
| Скорость потока: | 0,9 мл/мин. |

Относительное время удерживания: Ретинола миристат 0,74; Ретинола пальмитат (все-транс) 1,00; Витамин А (13-цис) 1,05; Витамин А (9-цис) 1,08;

Витамин А (9,13 -цис) 1,13; альфа-токоферола ацетат 1,39; Ретинола стеарат 0,49.

Для определения пригодности хроматографической системы в хроматограф вводят не менее 5 раз стандартный раствор.

На хроматограмме раствора:

*̶ относительное стандартное отклонение* площадей пиков ретинола пальмитата и альфа-токоферола ацетата - не более 10%;

*̶ эффективность хроматографической колонки* *(N)*, рассчитанная по пику ретинола пальмитата и пику альфа-токоферола ацетата - не менее 2000 теоретических тарелок;

*̶ фактор асимметрии пика* *(AS)* ретинола пальмитата и пика альфа-токоферола ацетата - не более 2,0.

Содержание ретинола пальмитата С36Н60О2 в одной таблетке в процентах от заявленного количества (X) вычисляют по формуле:

Х=$\frac{S\_{1}∙ a\_{0} ∙G ∙P∙N}{S\_{0}∙a ∙L∙N\_{0}},$

где: S1 - сумма площадей пиков, присутствующих на хроматограмме

 испытуемого раствора, с временами удерживания в пределах ( ±1 %)

относительно пика ретинола пальмитата;

So - сумма площадей пиков, присутствующих на хроматограмме стандартного раствора, с временами удерживания в пределах (±1 %) относительно пика ретинола пальмитата;

G - средняя масса таблеток, мг;

а - навеска порошка растёртых таблеток, мг;

ао - навеска стандартного образца, мг;

Р - содержание ретинола пальмитата в стандартном образце, %;

L - заявленное количество ретинола ацетата (α-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.

Содержание альфа-токоферола ацетата С32Н52О3 в одной таблетке в процентах от заявленного количества (X) вычисляют по формуле:

Х=$\frac{S\_{1}∙ a\_{0} ∙G ∙P∙N}{S\_{0}∙a ∙L∙N\_{0}},$

где: S1 - площадь пика альфа -токоферола ацетата на хроматограмме

 испытуемого раствора;

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

G - средняя масса таблеток, мг;

а - навеска порошка растертых таблеток, мг;

ао - навеска стандартного образца, мг;

Р - содержание альфа -токоферола ацетата в стандартном образце, %;

L - заявленное количество α-токоферола ацетата в одной таблетке, мг;

N - коэффициент разведения испытуемого раствора;

N0  - коэффициент разведения при приготовлении основного раствора стандартного образца альфа-токоферола ацетата.

***Тиамина нитрата, Пиридоксина гидрохлорида, Никотинамида и Кальция пантотената.*** Определение проводят методом ВЭЖХ (ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография»).

*Подвижная фаза А.* Растворяют 40,8 г калия дигидрофосфата в 996 мл воды, прибавляют 4,0 мл ацетонитрила, доводят значение pH до 3,9 фосфорной кислотой концентрированной и дегазируют. Подвижная фаза стабильна в течение 3 дней.

Подвижная фаза *В*. Ацетонитрил⎯Калия дигидрофосфата раствор 0,3 М 0,4:99,6.

*Испытуемый раствор.* Точную навеску порошка растёртых таблеток, эквивалентную по содержанию 50,0 мг тиамина нитрата, 25,0 мг пиридоксина гидрохлорида, 25,0 мг никотинамида и 29,0 мг кальция пантотената, переносят в мерную колбу вместимостью 500 мл, прибавляют 1,0 г ЭДТА, 8 мл хлористоводородной кислоты раствора 1 М и 300 мл хлористоводородной кислоты раствора 0,01 М. Полученный раствор обрабатывают ультразвуком в течение 10 мин, дают остыть и доводят до метки раствором хлористоводородной кислоты 0,01 М. Полученный раствор фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм (раствор для введения).

*Раствор стандартного образца.*  Около 240,0 мг (точная навеска) стандартного образца тиамина нитрата, около 110,0 мг (точная навеска) стандартного образца пиридоксина гидрохлорида, около 525,0 мг (точная навеска) стандартного образца никотинамида и около 150,0 мг (точная навеска) стандартного образца кальция пантотената помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в хлористоводородной кислоты растворе 0,01 М, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают.

В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 5,0 мл полученного раствора, прибавляют 83 мг аскорбиновой кислоты, доводят объем раствора в колбе хлористоводородной кислоты раствором 0,01 М до метки и перемешивают (раствор для введения).

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Предколонка | силикагель октадецилсилильный эндкипированный для хроматографии, 10 мкм  |
|  | между насосом и системой введения пробы; |
| Колонка | 300 х 3,9 мм, силикагель октадецилсилильный эндкипированный для хроматографии, 10 мкм; |
| Температура колонки  | 25 °С;  |

Давление колонки около 55 бар;

|  |  |
| --- | --- |
| Детектор | спектрофотометрический:280 нм – для тиамина, пиридоксина, никотинамида; 204 нм для кальция пантотената; |
| Объем пробы | 20 мкл; |
| Скорость потока | 1,3 мл/мин.  |

Относительное время удерживания: Тиамина нитрат 0,25; Пиридоксина гидрохлорид 0,35; Никотинамид 0,62; Кальция пантотенат 1,00.

Для определения пригодности хроматографической системы в хроматограф вводят не менее 5 раз стандартный раствор.

На хроматограмме раствора:

̶ *относительное стандартное отклонение* площадей пиков тиамина нитрата или пиридоксина гидрохлорида или никотинамида или кальция пантотената - не более 1,5 %;

̶ *эффективность хроматографической колонки (N)*, рассчитанная по пику тиамина нитрата или пиридоксина гидрохлорида или никотинамида или кальция пантотената - не менее 2000 теоретических тарелок;

̶ *фактор асимметрии пика* (*As*) тиамина нитрата или пиридоксина гидрохлорида или никотинамида или кальция пантотената - не более 2,0.

Оценка: обычным методом с использованием внешнего стандарта.

Содержание тиамина нитрата C12H17N4OSˑNO3  (или пиридоксина гидрохлорида C8H11NO3·HCI, никотинамида С6Н6N2O и кальция пантотената C18H32CaN2O10) в одной таблетке в процентах от заявленного (Х) количества вычисляют по формуле

Х=$\frac{S\_{1}∙ a\_{0} ∙G ∙P∙N}{S\_{0}∙a ∙L∙N\_{0}},$

где: S1 - площадь пика тиамина нитрата (или пиридоксина

гидрохлорида, или никотинамида, или кальция пантотената) на

хроматограмме испытуемого раствора;

So - площадь пика тиамина нитрата (или пиридоксина гидрохлорида, или никотинамида, или кальция пантотената) на хроматограмме стандартного раствора;

ао - навеска стандартного образца тиамина нитрата (или пиридоксина гидрохлорида, или никотинамида, или кальция пантотената), мг;

G - средняя масса таблеток, мг;

а - навеска порошка таблеток, взятая для приготовления испытуемого

раствора, мг;

Р - содержание тиамина нитрата (или пиридоксина гидрохлорида, или никотинамида, или кальция пантотената) в стандартном образце, %;

L - заявленное количество тиамина нитрата (или пиридоксина гидрохлорида, или никотинамида, или кальция пантотената) в одной таблетке, мг;

N - коэффициент разведения испытуемого раствора;

N0  - коэффициент разведения при приготовлении основного раствора стандартного образца тиамина нитрата (или пиридоксина гидрохлорида, или никотинамида, или кальция пантотената)

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

⃰При проведении данного определения необходимо испытуемый и стандартный растворы защищать от воздействия атмосферы и света, используя инертный газ и соответствующую лабораторную посуду.

*Подвижная фаза.* Октанол⎯диоксан⎯ гексан 10: 30:960.

*Испытуемый раствор*. Точную навеску порошка растертых таблеток эквивалентную по содержанию 14,2 мкг колекальциферола помещают в мерную колбу вместимостью 250 мл, прибавляют 25,0 мл хлористоводородной кислоты раствора 0,2 М и обрабатывают в течение 10 мин на ультразвуковой бане при температуре 60 °С, покачивая колбу. Затем прибавляют 20 мл этанола, встряхивают и в течение 10 мин обрабатывают на ультразвуковой бане при температуре 60 °С; охлаждают до температуры 20 °С, доводят объем раствора этанолом до метки и встряхивают. Часть полученного раствора центрифугируют в течение 10 мин. В колбу Эрленмейера вместимостью 250 мл, помещают 40,0 мл надосадочной жидкости, прибавляют 10,0 мл хлористоводородной кислоты раствора 0,01 М и 30,0 мл гексана. Колбу закрывают стеклянной пробкой и энергично встряхивают в течение 1 мин. Переносят содержимое колбы в мерный цилиндр вместимостью 100 мл и оставляют до оседания частиц; при необходимости центрифугируют.

Переносят 25,0 мл верхней гексановой фазы в подогретую круглодонную колбу вместимостью 50 мл, упаривают досуха на вакуумном роторном испарителе при температуре не выше 30 °С. Затем колбу охлаждают до температуры 20 °С (во избежание испарения растворителей), прибавляют 2,0 мл подвижной фазы и растворяют полученный сухой остаток в этом объеме подвижной фазы. Полученный раствор фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм.

*Раствор стандартного образца колекальциферола.* Около 65,0 мг (точная навеска) колекальциферола стандартного образца помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют на кончике шпателя бутилированный гидрокситолуол (ВТН), растворяют в гексане и доводят объем раствора тем же растворителем до метки, перемешивают.

В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 2,0 мл полученного раствора, доводят объем раствора гексаном до метки и перемешивают.

В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 2,0 мл полученного раствора и доводят объем раствора подвижной фазой до метки, перемешивают.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 250 х 4,6 мм, силикагель октадецилсилильный для хроматографии, 5 мкм;  |
| Температура колонки  | 25 °С;  |
| Детектор | спектрофотометрический, 263 нм;  |
| Объем пробы | 100 мкл; |
| Скорость потока | 2,3 мл/мин.  |

Время удерживания Около 8 мин

Для определения пригодности хроматографической системы в хроматограф вводят не менее 5 раз стандартный раствор.

На хроматограмме раствора:

̶ *относительное стандартное отклонение* площадей пиков колекальциферола - не более 10,0 %;

̶ *эффективность хроматографической колонки* *(N)*, рассчитанная по пику колекальциферола - не менее 6000 теоретических тарелок;

̶ *фактор асимметрии пика* *(AS)* колекальциферола - не более 2,0.

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

Х=$\frac{S\_{1}∙ a\_{0} ∙G ∙P∙N}{S\_{0}∙a ∙L∙N\_{0}},$

где: S 1- площадь пика колекальциферола на хроматограмме испытуемого

 раствора;

So - площадь пика колекальциферола на хроматограмме стандартного раствора;

ао - навеска стандартного образца колекальциферола, мг;

а - навеска порошка растертых таблеток для приготовления испытуемого раствора, мг;

G - средняя масса таблеток, мг;

Р - содержание колекальциферола в стандартном образце, %;

L - заявленное количество колекальциферола в одной таблетке, мг;

N - коэффициент разведения испытуемого раствора;

N0  - коэффициент разведения при приготовлении основного раствора стандартного образца колекальциферола.

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

*Подвижная фаза А.* В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 800 мл воды, 1,36 г натрия ацетата, 100 мл ацетонитрила, устанавливают значение pH до 3,0 уксусной кислотой ледяной, доводят объем раствора водой до метки, перемешивают и осторожно дегазируют.

*Подвижная фаза В.* Ацетонитрил⎯Ацетатный буфер 10:90.

*Раствор для разведения.* В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 36 г динатрия гидрофосфата, 5 г калия дигидрофосфата и 8 г натрия перхлората, прибавляют 18 мл аммиака раствора концентрированного, доводят объем раствора водой до метки, перемешивают и осторожно дегазируют.

*Испытуемый раствор*. Точную навеску порошка растертых таблеток эквивалентную по содержанию 0,5 мг фолиевой кислоты помещают в мерную колбу вместимостью 200 мл, доводят объем раствора раствором для разведения до метки и перемешивают на магнитной мешалке. При необходимости обрабатывают ультразвуком. Полученный раствор фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм.

*Раствор стандартного образца фолиевой кислоты.* Около 20,0 мг (точная навеска) фолиевой кислоты стандартного образца помещают в мерную колбу вместимостью 200 мл, растворяют в растворе для разведения и доводят объем раствора тем же раствором до метки, перемешивают.

В мерную колбу вместимостью 200 мл помещают 5,0 мл полученного раствора, доводят объем раствором для разведения до метки и перемешивают.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 125 х 4,6 мм, силикагель октадецилсилильный эндкепированный для хроматографии, 10 мкм; |
| Температура колонки  | 40 °С;  |
| Детектор | Спектрофотометрический, 282 нм; |
| Давление колонки | Около 150 бар; |
| Объем пробы | 20 мкл; |
| Скорость потока | 0,7 мл/мин.  |

Для определения пригодности хроматографической системы в хроматограф вводят не менее 5 раз стандартный раствор.

На хроматограмме раствора:

* *относительное стандартное отклонение* площадей пиков фолиевой кислоты - не более 4,0 %;
* *эффективность хроматографической колонки* *(N),* рассчитанная по пику фолиевой кислоты - не менее 1500 теоретических тарелок;
* *фактор асимметрии пика (AS)* фолиевой кислоты - не более 2,0.

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

Х=$\frac{S\_{1}∙ a\_{0}∙P∙ G∙N}{S\_{0}∙a\_{1}∙L∙N\_{0}},$

где: S1 - площадь пика фолиевой кислоты на хроматограмме испытуемого

 раствора;

So - площадь пика фолиевой кислоты на хроматограмме стандартного раствора;

ао - навеска фолиевой кислоты стандартного образца, мг;

G - средняя масса таблеток, мг;

а - навеска порошка таблеток, используемая для приготовления испытуемого раствора, мг;

Р - содержание фолиевой кислоты в стандартном образце, %;

L - заявленное количество фолиевой кислоты в одной таблетке, мг;

N - коэффициент разведения испытуемого раствора;

N0  - коэффициент разведения при приготовлении раствора стандартного образца фолиевой кислоты.

***Рибофлавин.*** Метод флуориметрии. (ОФС «Флуориметрия»).

Растворы рибофлавина чувствительны к свету, поэтому определение проводят тотчас после их приготовления при неярком искусственном освещении.

*Растворитель.* Уксусная кислота ледяная⎯пиридин⎯вода 1:10:40.

*Испытуемый раствор****.*** Точную навеску порошка измельченных таблеток, эквивалентную по содержанию около 9,1 мг рибофлавина, помещают в мерную колбу вместимостью 250 мл, прибавляют 5 мл уксусной кислоты раствора, 200 мл растворителя, нагревают на водяной бане до 80-90 °С в течение 10-15 мин, обрабатывают ультразвуком в течение 5 мин, охлаждают до температуры 20 °С, доводят объем раствора растворителем до метки и перемешивают. Часть полученного раствора центрифугируют и фильтруют полученную надосадочную жидкость.

В мерную колбу вместимостью 250 мл помещают 2,5 мл фильтрата и доводят объем раствора растворителем до метки (испытуемый раствор).

*Раствор стандартного образца рибофлавина.* Около 80,0 мг (точная навеска) рибофлавина стандартного образца помещают в мерную колбу вместимостью 200 мл и растворяют в 100,0 мл растворителя при нагревании до 80-90 °С на водяной бане в течение 10 мин. Охлаждают до температуры 20-25 °С, доводят объем раствора растворителем до метки и перемешивают.

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

В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 2,0 мл полученного раствора и доводят объем раствора растворителем до метки, перемешивают.

Концентрация полученного раствора рибофлавина около 0,4 мкг/мл. Срок годности раствора при хранении в защищенном от света месте — 1 сут.

В кюветы флуориметра помещают: в одну – 10 мл испытуемого раствора и в другую – 10 мл раствора рабочего стандартного образца рибофлавина и измеряют флюорисценцию при длине волны 440 нм.

Содержание рибофлавина C17H20N4O6 в одной таблетке в процентах от заявленного количества (X) вычисляют по формуле:

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

где: А - эмиссия испытуемого раствора;

А о - эмиссия стандартного раствора;

ао - навеска стандартного образца рибофлавина, мг;

G - средняя масса таблеток, мг;

а - навеска порошка таблеток, взятая для приготовления испытуемого раствора, мг

Р - содержание рибофлавина в стандартном образце, %;

L - заявленное количество рибофлавина в одной таблетке, мг;

N - коэффициент разведения испытуемого раствора;

N0  - коэффициент разведения при приготовлении раствора стандартного образца рибофлавина.

***Кальций, Магний, Железо, Медь, Марганец, Цинк и Молибден.***Метод атомно-абсорбционной спектрофотометрии (ОФС «Атомно-абсорбционная спектрометрия»).

Лантана гидрохлорида раствор 5 %. В мерную колбу вместимостью 500 мл помещают 22,4 г лантана гидрохлорида семигидрата, растворяют в 100 мл воды и 50 мл хлористоводородной кислоты раствора 30 %, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

*Испытуемый раствор.* В кварцевом тигле вместимостью 150 мл прокаливают 10 таблеток при температуре 450 °С в муфельной печи (при скорости нагревания 100 °С в ч), оставляют при этой температуре на 12 ч и после охлаждения кипятят в течение 10 мин с 20 мл воды, 20 мл хлористоводородной кислоты и 5 мл азотной кислоты. Содержимое тигля количественно переносят с помощью воды в мерную колбу вместимостью 250 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Фильтруют 25 мл полученного раствора.

 *Основной стандартный раствор.* 1 г кальция карбоната перекристаллизованного (сверхчистого) и 0,852 г диаммония гидрофосфата помещают в мерную колбу вместимостью 200 мл, растворяют в 20 мл воды и 12 мл хлористоводородной кислоты. В мерной колбе вместимостью 50 мл разбавляют 4,0 мл стандартного раствора до концентрации 1000 мкг/ мл водой.

В мерную колбу вместимостью 200 мл переносят 20,0 мл полученного раствора. Прибавляют растворы с концентрацией 1000 мкг/мл в следующем порядке: Си (8,0 мл), Zn (4,0 мл), Мn (4,0 мл); затем растворы с концентрацией 10000 мкг/мл в следующем порядке: Fe (8,0 мл) и Mg (15,0 мл). Полученный раствор кипятят на плитке в течение 10 мин. После охлаждения доводят объем раствора до метки водой. Стандартный раствор содержит 2000 мкг/мл Са, 750 мкг/мл Mg, 400 мкг/мл Fe, 40 мкг/мл Си, 20 мкг/мл Мn, 20 мкг/мл Zn, 8 мкг/мл Мо.

Схема разведений:

Основного стандартного раствора и испытуемого раствора

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Взять | 8,0 мл стандарта (St 1) |  | 4,0 мл стандарта+6,0 мл воды(St 1) |  | **Мо** |
|  | 10,0 мл стандарта (St 2) |  | 5,0 мл стандарта+5,0 мл воды(St 2) |  |  |
|  | 10,0 мл испытуемого раствора |  | 6,0 мл стандарта+4,0 мл воды(St 3) |  |  |
|  | 12,0 мл стандарта (St 3) + 1 мл |  | 10,0 мл испытуемого раствора+2 мл |  |  |
|  | хлористоводородной кислоты  |  | AlCl3 ·6H 2O 10 % раствора |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  | до 100 мл |  | **Fe, Сu, Mn, Zn** |  |  |
|  |  |  |  |  |
| Взять | 2,0 мл +1 мл хлористоводородной кислоты + 5 мл лантана раствора 5 % |  |  |  |
|  |  |  |  |  |
|  | до 100 мл | **Са** |  |  |
|  |  |  |  |  |
| Взять | 10,0 мл +1 мл хлористоводородной кислоты + 5 мл лантана раствора 5 % |  |  |  |
|  |  |  |  |  |
|  | До 50 мл | **Mg** |  |  |

*Пример разведения*: в мерной колбе вместимостью 100 мл к 8 мл основного стандартного раствора (например, St l) прибавляют 1 мл хлористоводородной кислоты и доводят объем раствора водой до метки и перемешивают; раствор используют для определения Fe, Сu, Mn, Zn. Затем 2 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 1 мл хлористоводородной кислоты 30 %, 5 мл лантана раствора 5 % и доводят объем раствора водой до метки; раствор используют для определения Са.

В мерную колбу вместимостью 50 мл, помещают 10 мл полученного раствора прибавляют 1 мл хлористоводородной кислоты 30 %, 5 мл лантана раствора 5 % и доводят объем раствора до метки; раствор используют для определения Mg.

Параметры прибора:

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Элемент | Са | Mg | **Fe** | **Си** | **Mn** | **Zn** | **Мо** |
| Длина волны (нм) | 422,7 | 285,2 | 372,0 | 324,7 | 279,5 | 213,9 | 313,3 |
| Щель (нм) | 0,7 | 0,7 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,7 | 0,7 |
| Горелка для  | ̶ | ̶ | ̶ | ̶ | ̶ | ̶ | х |
| Фактор расширения | 2 | 2 | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 |
| Время интеграции (сек) | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |

Концентрации элементов в измеряемых стандартных растворах в мкг/мл

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Са | Fe | Mn | Mo | Mg | Cu | Zn |
| 3,2 | 32 | 1,6 | 2,67 | 0,24 | 3,2 | 1,6 |
| 4,0 | 40 | 2,0 | 3,33 | 0,30 | 4,0 | 2,0 |
| 4,8 | 48 | 2,4 | 4,00 | 0,36 | 4,8 | 2,4 |

По результатам определения стандартных растворов строят калибровочную кривую зависимости поглощения от концентрации соответствующего элемента в растворе (мг/мл).

Содержание Са, мг в одной таблетке (X1) рассчитывают по формуле:

X1, = С 12,5,

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

Содержание Fe, Си, Mn, Zn мг в одной таблетке (Х2) рассчитывают по формуле:

Х2 = С 0,25,

где: С - концентрация Fe, Си, Mn, Zn в испытуемом растворе, мкг/мл, найденная автоматически или по калибровочному графику;

Содержание Mg мгв одной таблетке (Хз) рассчитывают по формуле:

Х3 =С·62,5,

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

Содержание Mo мкг в одной таблетке (Х4) рассчитывают по формуле:

Х4 = С 30,0,

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

***Фосфор****.* Метод спектрофотометрический (ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях»).

Реактив I. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 780 мг аммония молибдата растворяют в 50 мл воды, прибавляют 40 мл серной кислоты раствора 10 %, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Реактив готовят непосредственно перед использованием.

Реактив II. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 10 г железа (II) сульфата растворяют в 20 мл серной кислоте растворе 10 % , доводят объем раствора до метки водой и перемешивают. Готовят реактив непосредственно перед использованием.

*Испытуемый раствор.*  20 мл испытуемого раствора, приготовленного для определения содержания металлов методом атомно-абсорбционной спектрометрии (приготовление испытуемого раствора), помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл и доводят объем раствора хлористоводородной кислоты раствором 0,4 % до метки.

*Стандартный раствор*. Используют основной стандартный раствор,

приготовленный для определения содержания кальция, магния, железа, меди, марганца, цинка и молибдена методом атомно-абсорбционной спектрофотометры и (приготовление основного стандартного раствора)

В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 20 мл основного стандартного раствора и доводят объем раствора хлористоводородной кислоты раствором 0,4 % до метки, перемешивают.

Цветная реакция

В пять мерных колб вместимостью 25 мл помещают следующие растворы в последовательности, указанной ниже и перемешивают после добавления каждого раствора:

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | контрольный | St1 | St2 | S1 | S2 |  мл |
| Стандартный раствор | ̶ | 5,0 | 5,0 | ̶ | ̶ | мл |
| Испытуемый раствор | ̶ | ̶ | ̶ | 5,0 | 5,0 | мл |
| Хлористоводородная кислота 0,4 % | 5,0 | ̶ | ̶ | ̶ | ̶ | мл |
| Реактив I | 10,0 | 10,0 | 10,0 | 10,0 | 10,0 | мл |
| Реактив II | 5,0 | 5,0 | 5,0 | 5,0 | 5,0 | мл |

После добавления Реактива II объемы растворов доводят до метки водой и перемешивают.

Через 30 мин после добавления Реактива II проводят измерение оптической плотности растворов, имеющих голубой цвет, на спектрофотометре при длине волны 720 нм в кювете с толщиной слоя 1 см. В качестве раствора сравнения используют контрольный раствор.

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

Х=$\frac{A∙a\_{0} ∙ 0,2345 ∙1,25∙100}{A\_{0}∙ 10 },$

где: А - оптическая плотность испытуемого раствора;

А о- оптическая плотность стандартного раствора;

ао - масса диаммония фосфата, взятая для приготовления основного стандартного раствора, мг;

0,2345 - коэффициент пересчета на фосфор;

1,25 - величина разведения;

10 - количество таблеток, взятых для определения, шт.

***Аскорбиновая кислота.*** Метод титриметрии.

*Метафосфорной кислоты раствор*. Растворяют 30 г метафосфорной кислоты в смеси 80 мл уксусной кислоты безводной и 500 мл воды, и разбавляют до 1000 мл водой; при необходимости раствор фильтруют.

*Испытуемый раствор.* Точную навеску порошка растертых таблеток, эквивалентную по содержанию около 109,0 мг аскорбиновой кислоты, помещают в колбу Эрленмейера вместимостью 250 мл, закрывающуюся стеклянной пробкой, прибавляют 25 мл этанола и обрабатывают ультразвуком в течение 5 мин. Затем прибавляют 150 мл метафосфорной кислоты раствора и взбалтывают в течение 5-10 мин. Титруют полученный раствор 0,1 М раствором йода, используя в качестве индикатора крахмал.

Содержание аскорбиновой кислоты (X) в одной таблетке в процентах вычисляют по формуле:

Х=$\frac{V∙К∙0,0008806∙G∙100}{a∙L}=\frac{V∙К∙0,08806∙G}{a∙L}$,

где: V - объем 0,1 М раствора йода, израсходованного на титрование

испытуемого раствора, мл;

К - поправочный коэффициент к 0,1 М раствору йода;

а - навеска препарата, г;

G - средняя масса содержимого капсулы, г;

L - заявленное количество аскорбиновой кислоты в одной таблетке, г.

0,0008806 - количество аскорбиновой кислоты, соответствующее 1 мл

0,1 М раствора йода, г.

 ***Биотин*.** Метод микробиологический. (ОФС «Определение содержания витаминов в многокомпонентных лекарственных препаратах микробиологическим методом», метод 1 (пробирочный метод)).

*Тест-микроорганизм и основная культура*: используют *Lactobacillus plantarum ВКМ В-578 (*ATCC 8014)

**Цианокобаламина**. Метод микробиологический. (ОФС «Определение содержания витаминов в многокомпонентных лекарственных препаратах микробиологическим методом», метод 1 (чашечный метод)).

Тест-микроб *Escherichia coli* 113-3.

⃰Растворы, содержащие цианокобаламин, не должны подвергаться воздействию солнечного или слишком яркого дневного света.

**Хранение.** В соответствии с ОФС «Хранение лекарственных средств».