**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 + Марганец + Медь + Селен + Цинк + Хром, таблетки жевательные*****Acidum ascorbicum + Calcium pantotenas + Colecalciferolum + Nicotinamidum + Pyridocxini hydrochloridum + Retinoli acetas + Riboflavinum + Thiamini nitras + a-Tocopheryli acetas + Acidum folicum + Cyanocobalaminum + Ferrum + Iodum + Manganum + Cuprum + Selenium + Zincum + Chromium, tabulettae masticatoriae*** |  **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 + Марганец + Медь + Селен + Цинк + Хром, таблетки жевательные.

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 C6H8O – 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 150 %;

̶ 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 150 %;

̶ 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 150 %;

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

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

̶ железо в виде железа карбонила Fe(CO)5 – не менее 90 % и не более 145 %;

̶ медь в виде меди (II) оксида CuO – не менее 90 % и не более 145 %;

̶ цинк в виде цинка оксида ZnO – не менее 90 % и не более 145 %;

̶ хром в виде хрома хлорида гексагидрата CrCl3·6H2O – не менее 90 % и не более 145 %;

̶ марганец в виде марганца сульфата моногидрата MnSO4·H2O – не менее 90 % и не более 145 %;

̶ селен в виде натрия селената Na2SeO4 – не менее 90 % и не более 145 %;

̶ йод в виде калия йодида KI – не менее 90 % и не более 145 %.

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

**Подлинность**

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

Время удерживания основных пиков на хроматограммах испытуемых растворов *ретинола ацетата, альфа-токоферола ацетата,* колекальциферола, т*иамина нитрата, рибофлавина, пиридоксина гидрохлорида, никотинамида,*

 *кальция пантотената, фолиевой кислоты, цианокобаламина, аскорбиновой кислоты* должно соответствовать времени удерживания пиков на хроматограммах соответствующих растворов стандартного образца или стандартных растворов.

*Оптическая эмиссионная спектрометрия с индуктивно - связанной плазмой* (ИСП-ОЭС) по разделу «Количественное определение *Железо, Цинк, Медь, Марганец*» в соответствии с ОФС «Атомно-эмиссионная спектрометрия» Длина волны эмиссии минерала в испытуемом растворе Железо, Цинк, Медь, Марганец 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».

**Количественное определение**

***Ретинола ацетат, альфа-токоферола ацетат.*** Определение проводят методом ВЭЖХ с обращенной фазой. (ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография»).

⃰Ретинола ацетат, альфа-токоферола ацетат обладают чувствительностью к свету, поэтому необходимо использовать светозащитную лабораторную посуду (посуду темного стекла, светозащитные центрифужные пробирки и светозащитные пробирки для ВЭЖХ), а так же держать пробирки для ВЭЖХ в защищенном от света месте.

*Аммония гидроксида раствор 4 % (pH 9,5).* Разбавляют 143 мл аммония гидроксида водой до 1000 мл и хорошо перемешивают. Доводят pH до 9,5 с помощью фосфорной кислоты концентрированной. Раствор используют свежеприготовленным.

*Протеазы щелочной раствор.* Разбавляют 1 мл протеазы щелочной водой до 100 мл и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

*Раствор А.* Прибавляют 1,2 г бутилгидрокситолуола к 800 мл толуола и 400 мл метанола и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

*Подвижная фаза А*. Метанол.

*Подвижная фаза В*. Вода мили-Q.

*Подвижная фаза С.* *трет-*Бутилметиловый эфир.

*Испытуемый раствор.* Точную навеску порошка растертых таблеток эквивалентную около 2,3 мг ретинола ацетата, 28,5 мг альфа-токоферола ацетата помещают в мерную колбу вместимостью 250 мл, прибавляют 25 мл аммония гидроксида раствора 4 % (pH 9,5). Прибавляют 1,0 мл протеазы щелочной раствора и перемешивают содержимое колбы вручную или, при необходимости, используя встряхиватель, для распада твердых частиц порошка. Содержимое колбы обрабатывают ультразвуком в течение 15 мин при температуре около 55 °С, постоянно помешивая вручную. Охлаждают содержимое колбы до температуры 15–25 °С. Прибавляют около 4 г натрия хлорида и перемешивают.

Прибавляют в колбу 75,0 мл раствора А и перемешивают в течение 20 мин, используя мешалку. Переносят около 40 мл содержимого колбы в центрифужную пробирку. Центрифугируют для разделения водной и органической фаз. В качестве испытуемого раствора используют верхний слой (органическую фазу). Срок годности испытуемого раствора при температуре 2 - 8 °С и 15-25 °С не более 5 сут.

*Исходный стандартный раствор ретинола ацетата и альфа-токоферола ацетата.* Около 260,0 мг (точная навеска) стандартного образца ретинола ацетата и около 200,0 мг (точная навеска) стандартного образца альфа-токоферола ацетата помещают в центрифужную пробирку объемом 50 мл. Прибавляют 10,0 мл аммония гидроксида раствора 4% (pH 9,5), затем прибавляют 1,0 мл протеазы щелочной раствора и обрабатывают ультразвуком в течение 15 мин при температуре около 55 °С, постоянно помешивая вручную. Охлаждают до температуры 15 -25 °С, прибавляют около 4 г натрия хлорида к раствору и перемешивают.

*Контрольный исходный стандартный раствор ретинола ацетата и альфа - токоферола ацетата.* Приготовление аналогично исходному стандартному раствору ретинола ацетата и альфа-токоферола ацетата.

*Стандартный раствор.* Помещают 30,0мл раствора А в центрифужную пробирку, содержащую исходный стандартный раствор ретинола ацетата и альфа-токоферола ацетата, перемешивают на мешалке в течение 20 мин. Центрифугируют около 5 мин при 2500 об/мин для разделения водной и органической фаз.

В мерную колбу вместимостью 25 мл переносят 3,0 мл верхнего слоя (органической фазы), доводят объём раствором А до метки и перемешивают.

Раствор используют свежеприготовленным, защищая от воздействия света.

*Раствор для определения пригодности хроматографической системы.*

Приготовление аналогично приготовлению стандартного раствора.

Раствор используют свежеприготовленным, защищая от воздействия света.

Хроматографические условия:

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка: | 300 х 3,9 мм силикагель октадецилсилильный, эндкепированный для хроматографии, 5 мкм. |
| Температура колонки: | 25 °С |
| Детектор: | УЭФ, 280 нм |
| Объем пробы: | 10 мкл |
| Скорость потока: | 1,8 мл/мин |

Время хроматографирования: около 52 мин.

Программа градиентного элюирования:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Время,Мин | Подвижная фаза А (%) | Подвижная фаза В (%) | Подвижная фаза С (%) |
| 0,0 | 92 | 8 | 0 |
| 15,0 | 92 | 8 | 0 |
| 15,1 | 97 | 3 | 0 |
| 36,0 | 97 | 3 | 0 |
| 36,1 | 100 | 0 | 0 |
| 41,0 | 100 | 0 | 0 |
| 41,1 | 40 | 0 | 60 |
| 44,1 | 40 | 0 | 60 |
| 44,2 | 100 | 0 | 0 |
| 49,2 | 100 | 0 | 0 |
| 49,3 | 92 | 8 | 0 |
| 52,0 | 92 | 8 | 0 |

Проверка пригодности хроматографической системы.

На хроматограмме раствора:

* *фактор асимметрии (AS)* *для пиков* ретинола ацетата и альфа-токоферола ацетата на хроматограмме стандартного раствора - не более 2,0;
* *относительное стандартное отклонение* площадей пиков ретинола ацетата и альфа- гокоферола ацетата для шести последовательных введений стандартного раствора - не более 3,0 %;
* *степень извлечения для ретинола* ацетата и альфа-токоферола ацетата для стандартного раствора (средняя площадь пика, полученная после введения шести последовательных инъекций стандартного раствора) и раствора для определения пригодности хроматографической системы - 95,0 % - 105,0 %.

Раздельно вводят в жидкостной хроматограф стандартный раствор (шесть раз), раствор для определения пригодности хроматографической системы и испытуемый раствор, регистрируют хроматограммы и определяют площади основных пиков.

Содержание ретинола ацетата С22Н32О2 в таблетке в процентах от заявленного количества (X) вычисляют по формуле:

Х=$\frac{S\_{1}∙ a\_{0} ∙ P\_{1} ∙ P\_{2}∙G∙N}{s\_{0}∙a ∙L∙N\_{0}},$

где: S1 - площадь пика ретинола ацетата (транс изомера) на хроматограмме

испытуемого раствора;

So - площадь пика ретинола ацетата (транс изомера) на

хроматограмме стандартного раствора;

ао - навеска стандартного образца ретинола ацетата, мг;

Р1 - содержание ретинола ацетата в стандартном образце, %;

Р2- содержание ретинола ацетата (транс изомера) в стандартном

образце, %;

а - навеска образца таблеток, г;

G - средняя масса таблеток, г;

L – заявленное количества ретинола ацетата в одной таблетке, мг;

N - коэффициент разведения испытуемого раствора;

N0 - коэффициент разведения при приготовлении основного раствора

стандартного образца ретинола ацетата.

2906,98 ME - количество международных единиц ретинола в мг ретинола ацетата.

Содержание альфа-токоферола ацетата С31Н52О3 в таблетке в процентах от заявленного количества (Х) вычисляют по формуле:

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

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

 испытуемого раствора;

S0 - площадь пика альфа-токоферола ацетата на хроматограмме стандартного раствора;

ао - навеска стандартного образца альфа-токоферола ацетата, % миллиграммах

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

а - навеска образца таблеток, г;

G - средняя масса таблеток, г;

L – заявленное количества альфа-токоферола ацетата в одной таблетке, г;

N - коэффициент разведения испытуемого раствора;

N0  - коэффициент разведения при приготовлении основного раствора

стандартного образца альфа-токоферола ацетата.

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

⃰Колекальциферол обладает чувствительностью к свету, поэтому необходимо использовать светозащитную лабораторную посуду (посуду темного стекла или посуду, обернутую алюминиевой фольгой, светозащитные центрифужные пробирки и светозащитные пробирки для ВЭЖХ), и хранить пробирки для ВЭЖХ в защищенном от света месте.

Подвижная фаза А. Пентанол⎯гексан 0,6:99,4.

Подвижная фаза В. Пентанол⎯гексан 20:80.

Испытуемый раствор. Точную навеску порошка растертых таблеток эквивалентную около 50,0 мкг колекальциферола, осторожно помещают в коническую колбу вместимостью 250 мл. Прибавляют 15,0 мл воды и перемешивают на встряхивателе до получения гомогенной суспензии. К полученному раствору в указанном порядке прибавляют 25 капель (около 0,5 мл) протеазы щелочной и 10,0 мл диметилсульфоксида, перемешивают на встряхивателе до полного смачивания порошка.

К содержимому колбы прибавляют 25,0 мл метанола, нагревают колбу на водяной бане в течение 5 мин при температуре около 47 °С, периодически перемешивая на встряхивателе, для растворения витамина D3.

К содержимому колбы прибавляют около 10 г натрия хлорида и перемешивают на встряхивателе для насыщения водной фазы. Охлаждают колбу до температуры 15-25 °С, прибавляют 50,0 мл гексана и экстрагируют при перемешивании с помощью встряхивателя в течение 15-20 мин.

Порцию содержимого колбы (около 40 мл) переносят в центрифужную пробирку. Центрифугируют в течение 10 мин при 2500 об/мин для разделения фаз. Верхнюю фазу используют в качестве испытуемого раствора, анализируя методом ВЭЖХ. Раствор хранят при температуре 15-25 °С в течение 1 сут.

*Растворы стандартны образцов колекальциферола*.

*Исходный раствор стандартного образца колекальциферола*. Около 40,0 мг (точная навеска) стандартного образца колекальциферола (предварительно выдержанного в помещении до температуры 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 колекальциферола* С1. В мерную колбу вместимостью 250 мл помещают 6,0 мл исходного стандартного раствора, растворяют в гексане, доводят объем раствора гексаном до метки и перемешивают.

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

*Раствор стандартного образца колекальциферола* С3. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 8,0 мл исходного стандартного раствора, растворяют в гексане, доводят объем раствора гексаном до метки и перемешивают. Растворы хранят при температуре 2-8 °С в течение 6 сут.

Раствор для определения пригодности хроматографической системы.

Около 40,0 мг (точная навеска) стандартного образца колекальциферола (предварительно выдержанного при температуре 15–25 °С) помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл. Растворяют в гексане, доводят объем раствора гексаном до метки и перемешивают.

В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 4,0 мл раствора, 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.

Хроматографические условия:

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка: | 250 х 4,6 мм силикагель октадецилсилильный эндкепированный для хроматографии, 5 мкм;  |
| Температура колонки:  | 25 °С ; |
| Температура образца: | 5 °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 С3 и раствор для определения пригодности хроматографической системы:

* *степень извлечения колекальциферола* для раствора для определения пригодности хроматографической системы по отношению к стандартному раствору С2 (средняя площадь пика, полученная после введения пяти последовательных инъекций стандартного раствора) должна быть в пределах 97,5 % - 102,5 %;

*̶ коэффициент линейности (R2)* для стандартных растворов С1, С2 и С3 - не менее 0,99.

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

Концентрацию колекальциферола (витамина D3) в стандартных растворах для каждого уровня калибровки (CСn, МЕ/мл) вычисляют по формуле:

СС1 =$\frac{ a\_{0} ∙40000∙P∙4∙}{100∙100}∙\frac{6}{250}$,

СС2 =$\frac{ a\_{0} ∙40000∙P∙4∙}{100∙100}∙\frac{5}{100}$,

СС3 =$\frac{ a\_{0} ∙40000∙P∙4∙}{100∙100}∙\frac{8}{100}$,

где: ао - навеска стандартного образца колекальциферола, мг;

Р - содержание основного вещества в стандартном образце в долях

единицы.

Содержание колекальциферола (витамина D3) в таблетке в ME (X1) вычисляют по формуле:

Х1=$\frac{ C\_{c}∙50∙G}{a∙ L}$,

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

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

а- навеска испытуемого образца, г;

G - средняя масса таблетки, г.

Х2 =Х1 ·0,025

где: 0,025- фактор пересчета ME, мкг.

Содержание колекальциферола C27H44O (витамина D3) в таблетке в процентах от заявленного количества (X) вычисляют по формуле:

Х =$\frac{Х\_{1} ∙0,025∙100}{1000000}=\frac{ C\_{c}∙50∙G·0,025·100}{a∙ L·1000000}=\frac{ C\_{c}∙G·0,025}{a∙ L·200}$,

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

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

а- навеска испытуемого образца, г;

G - средняя масса таблеток, г;

L - заявленное количества колекальциферола в одной таблетке, мг.

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

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

 *Раствор для экстракции.* Растворяют 5,0 г аммония тиоцианата в 960 мл

диметилсульфоксида, прибавляют 40,0 мл уксусной кислоты ледяной и перемешивают.

*Натрия гидрокарбоната раствор 0,05 М.* Растворяют около 4,2 г натрия гидрокарбоната в 1000 мл воды, перемешивают.

Подвижная фаза А. 0,006 *М буферный раствор натрия гексансульфоната (pH 3,5).* Растворяют 4,7 г натрия гексансульфоната в 4000 мл воды. Прибавляют 5,0 мл фосфорной кислоты концентрированной, перемешивают. Доводят значение pH до 3,5 с помощью калия гидроксида раствора 50 %. При необходимости фильтруют раствор через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм и дегазируют.

Подвижная фаза В. Ацетонитрил.

Испытуемый раствор. Точную навеску порошка растертых таблеток эквивалентное по содержанию 0,5 мг тиамина нитрата,0,57 мг рибофлавина*,* 0,64 мг пиридоксина гидрохлорида, 2,14 мг пантотеновой кислоты, 6,42 мг никотинамида*,* количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл. Прибавляют около 5,0 мл раствора для экстракции, помешивают колбу 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. Прибавляют 10,0 мл 1 % раствора натрия тиосульфата и около 50 мл уксусной кислоты раствора 1 %. Перемешивают содержимое колбы на мешалке в течение 10 мин, доводят уксусной кислоты раствором 1% до метки, перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

Растворы стандартных образцов.

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

Исходный стандартный раствор. 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 25,0 мг стандартного образца рибофлавина и около 20,0 мг (точная навеска) стандартного образца тиамина нитрата 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.

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

Стандартный раствор. В мерную колбу вместимостью 100 мл переносят 6,0 мл исходного стандартного раствора. Прибавляют 10 мл натрия тиосульфата раствора 1 %, доводят уксусной кислоты раствором 1 % до метки и перемешивают. 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%, доводят уксусной кислоты раствором 1% до метки и перемешивают

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

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;УФ, 250 нм для никотинамида;УФ, 210 нм для пантотеновой кислоты; |
| Скорость потока: | 1,0 мл/мин и 1,5 мл/мин; |
| Объем пробы: | 10 мкл. |

Время хроматографирования: около 19 мин

Последовательность выхода пиков витаминов и примерные времена их удерживания: никотинамид - около 1,9 мин; пантотеновая кислота - около 2,8 мин; пиридоксин - около 5,9 мин; тиамин - около 11,2 мин; рибофлавин - около 13,2 мин.

Программа градиентного элюирования:

Процентное соотношение подвижных фаз А и В может быть изменено для разделения всех пиков и соответствия требованиям пригодности хроматографической системы.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Время, мин | Подвижная фаза А (%) | Подвижная фаза В (%) | Скоростьпотока(мл/мин) |
| 0,0 | 96,0 | 4,0 | 1,0 |
| 4,0 | 96,0 | 4,0 | 1,0 |
| 4,1 | 96,0 | 4,0 | 1,5 |
| 11,0 | 91,0 | 9,0 | 1,5 |
| 12,0 | 87,0 | 13,0 | 1,5 |
| 12,5 | 87,0 | 13,0 | 1,5 |
| 12,6 | 65,0 | 35,0 | 1,5 |
| 14,0 | 65,0 | 35,0 | 1,5 |
| 14,1 | 96,0 | 4,0 | 1,0 |
| 19,0\* | 96,0 | 4,0 | 1,0 |

\*- для уравновешивания колонки время хроматографирования может быть изменено, в зависимости от используемой системы ВЭЖХ

Программа промывания колонки (скорость потока 1,0 мл/мин. температура колонки 25 °С.

После проведения анализа промывают колонку согласно таблице ниже.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 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;
* *разрешение* *(RS)* между пиком 1 (пик из-за ароматизатора малинового) и пиком тиамина должно быть не менее 1,5;
* *относительное стандартное отклонение* площадей пиков каждого витамина для шести последовательных инъекций стандартного раствора - не более 3,0%;
* *сходимость раствора для определения* *пригодности хроматографической* системы и стандартного раствора (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, рассчитанное по шести повторным инъекциям стандартного раствора, промежуточным инъекциям стандартного раствора и заключительной инъекции стандартного раствора - не более не более 3,0 %.

При необходимости фильтруют порции стандартного раствора и испытуемого раствора через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм, отбрасывая первые 2 мл фильтрата.

Раздельно вводят в жидкостной хроматограф раствор сравнения, испытуемый раствор для проверки разделения между пиком 1 и пиком тиамина, стандартный раствор (шесть раз), раствор для определения пригодности хроматографической системы и испытуемый раствор, регистрируют хроматограммы и определяют площади основных пиков.

Содержание тиамина нитрата C12H17N4OSˑNO3, рибофлавина C17H20N4O6, пиридоксина гидрохлорида C8H11NO3·HCI, никотинамида С6Н6N2O и пантотеновой кислоты C9H17NO5 в таблетке в процентах от заявленного количества (X) вычисляют по формуле:

Х=$\frac{S\_{1}∙ a\_{0}∙P∙G∙F∙N}{S\_{0}∙ a\_{1}∙L∙N\_{0}}=\frac{S\_{1}∙ a\_{0}∙P∙G·6∙100·F∙100}{S\_{0}∙ a\_{1}∙200·100·100·L}=\frac{S\_{1}∙ a\_{0}∙P∙G·F∙0,03}{S\_{0}∙ a\_{1}∙L}$,

где: S1 - площадь пика витамина на хроматограмме испытуемого раствора;

S0 - площадь пика витамина на хроматограмме стандартного раствора;

ао - навеска стандартного образца, мг;

Р - содержание витамина в стандартном образце, %;

а - навеска испытуемого образца, г;

G - средняя масса таблеток, г;

N - коэффициент разведения испытуемого раствора;

N0  - коэффициент разведения при приготовлении основного раствора

стандартного образца витаминов.

F- фактор пересчета:

тиамина мононитрата - 1

для рибофлавина -1

для пиридоксина гидрохлорида-1

для никотинамида -1

для пантотеновой кислоты - 0,92.

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

⃰Витамин В12 обладает чувствительностью к свету, поэтому следует использовать светозащитную лабораторную посуду (посуду темного стекла, светозащитные центрифужные пробирки и светозащитные пробирки для ВЭЖХ), а так же держать пробирки для ВЭЖХ в защищенном ог света месте.

*Калия дигидрофосфата буферный раствор (pH 4,5.* Растворяют 27,2 г калия дигидрофосфата в 2000 мл воды. Доводят значение pH до 4,5, используя натрия гидроксида раствор 50 % или фосфорную кислоту концентрированную.

*Разбавитель.* Метанола⎯ калия дигидрофосфата буферный раствор (pH 4,5) 160:840.

Подвижная фаза А. Калия дигидрофосфата буферного раствора (pH 4,5) фильтруют под вакуумом через фильтр с диаметром пор 0.45 мкм и дегазируют, при необходимости.

Подвижная фаза В. Ацетонитрил⎯подвижная фаза А 400:600. Фильтруют под вакуумом через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

Испытуемый раствор. Точную навеску порошка растертых таблеток эквивалентную 2,0 мкг цианокобаламина количественно переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл. Прибавляют около 25 мл разбавителя, перемешивают с помощью встряхивателя типа Vortex для диспергирования порошка. Стенки колбы ополаскивают 5 мл разбавителя, перемешивают содержимое колбы с помощью мешалки в течение 30 мин при максимальной скорости. Доводят объем содержимого колбы разбавителем до метки и перемешивают с использованием магнитного брусочка в течение 30 мин.

Переносят содержимое колбы в пластиковую центрифужную пробирку вместимостью 50 мл и центрифугируют в течение 5 мин со скоростью около 4000 об/мин. Часть центрифугата фильтруют, используя фильтр с диаметром пор 1,2 мкм и отбрасывая первые 2 миллилитра фильтрата. Раствор используют свежеприготовленным.

Исходный раствор стандартного образца. Необходимое количество стандартного образца цианокобаламина взвешивают в мерную колбу темного стекла подходящего объема, чтобы получить, после доведения водой до метки, раствор с концентрацией около 1,96 мкг/мл.

Наименьшее количество стандартного образца цианокобаламина 1 % используемое для анализа, - 25 мг.

При использовании стандартного образца цианокобаламина (кристаллического). Около 49,0 мг (точная навеска) стандартного образца цианокобаламина помещают в мерную колбу вместимостью 250 мл, растворяют в воде и доводят водой до метки, перемешивают.

В мерную колбу вместимостью 100 мл переносят 1,0 мл полученного раствора, доводят водой до метки и перемешивают.

*Примечание*

 цианокобаламин (кристаллический) выпускается с чистотой практически 100 %. Если чистота стандартного образца указана как 100 %, используют навеску - около 49,0 мг, если указана другая чистота, массу навески корректируют соответственно.

При использовании стандартного образца цианокобаламина 1%. Около 49,0 мг (точная навеска) стандартного образца цианокобаламина помешают в мерную колбу вместимостью 250 мл, растворяют в воде и доводят водой до метки, перемешивают.

При использовании рабочего стандартного образца цианокобаламина 1 %:

около 49,0 мг (точная навеска) рабочего стандартного образца цианокобаламина помещают в мерную колбу вместимостью 250 мл, растворяют в воде и доводят водой до метки, перемешивают.

*Примечание:* навеска - 49 мг указана для стандартного образца цианокобаламина с чистотой 1,00 %. При использовании стандартного образца другой чистоты масса навески должна быть откорректирована соответственно (например, для стандартного образца цианокобаламина с чистотой 0,875 % потребуется навеска - 56 мг).

Растворы Стандартных образцов цианокобаламина.

 *Раствор стандартного образца* цианокобаламина *С1, концентрация 0,0196 мкг/мл.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 1,0 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 стандартного образца, доводят разбавителем до метки и перемешивают.

Растворы используют свежеприготовленными.

Раствор для определения пригодности хроматографической системы.

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

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

Хроматографические условия.

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

Время хроматографирования: 14 мин.

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 |
| 14,0\* | 95,0 | 5,0 |

**\*-**для уравновешивания колонки время хроматографирования может быть изменено, в зависимости от используемой системы ВЭЖХ.

Проверка пригодности хроматографической системы.

Устанавливают требуемые параметры и уравновешивают хроматографическую систему с помощью подвижных фаз А и В (в соотношении 95:5) до установления устойчивой базовой линии. Оптимизируют условия хроматографирования для получения времени удерживания цианокобаламина между 5 и 8.

На хроматограмме раствора:

̶ эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику цианокобаламина - более 25000 теоретических тарелок;

* фактор асимметрии *(AS)* 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, строят кривую калибровки, используя три стандартных раствора (С1, С2 и С3).

̶ *коэффициент линейности (R2)* для стандартных растворов С1, С2 и С*3* - не менее 0,99;

̶ *степень извлечения цианокобаламина* для раствора для определения пригодности хроматографической системы по отношению к стандартному раствору С2 (средняя площадь пика, полученная после введения пяти последовательных инъекций стандартного раствора) должна быть в пределах 95 % - 105 %.

Раздельно вводят в жидкостной хроматограф 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 %) вычисляют по формуле:

Х= $\frac{S-S\_{ср}}{S\_{ср}}∙100$

где: Scp - средняя площадь пика цианокобаламина на хроматограмме

стандартного раствора, полученная после введения пяти последовательных инъекций стандартного раствора;

S - площадь пика цианокобаламина на хроматограмме стандартного раствора, полученная после последней инъекции 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=$\frac{С∙50∙G∙100}{a∙L∙1000000}=\frac{С∙G}{a∙L∙20}$,

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

а - навеска испытуемого образца, г;

G - средняя масса таблетки, г.

L - заявленное количества цианокобаламина в одной таблетке, мг;

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

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

*Натрия дигидрофосфата раствор 2 М.*  В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 27,6 г натрия дигидрофосфата моногидрата. Растворяют в воде, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

*Натрия дигидрофосфата раствор 50 мМ (pH 2,5).* В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 6,9 г натрия дигидрофосфата моногидрата, растворяют в 900 мл воды, доводят значение pH до 2,5 с помощью фосфорной кислоты концентрированной, доводят водой объем раствора до метки и перемешивают.

*Натрия гидроксида раствор 2,5 М.* В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 100 г натрия гидроксида. Растворяют в воде, охлаждают до температуры 15–25 °С, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

*Раствор для экстракции 0,78 % (м/об).* В мерную колбу вместимостью 1000 мл переносят 30,0 мл тетрабутиламмония гидроксида раствора 1 М, растворяют в воде, доводят водой объем раствора до метки и перемешивают.

*Раствор для экстракции 0,78 % (м/об) (pH 7,6).*  В мерную колбу вместимостью 1000 мл, переносят 30,0 мл 1 М раствора тетрабутиламмония гидроксида, прибавляют около 900 мл воды, доводят pH с помощью натрия дигидрофосфата раствора 2 М до 7,6, доводят водой объем раствора до метки и перемешивают.

Рекомендуемые растворы для промывания:

*Раствор для промывания А.* Ацетонитрил⎯вода 10:90.

*Раствор для промывания В*. Вода⎯Ацетонитрил 20:80.

Подвижная фаза А. Натрия дигидрофосфата раствор 50 мМ (pH 2,5).

Подвижная фаза В. Ацетонитрил⎯Натрия дигидрофосфата раствор 50 мМ (pH 2,5)⎯ 50:50.

Испытуемый раствор. Точную навеску порошка растертых таблеток эквивалентную 57,0 мкг фолиевой кислоты количественно переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл. Прибавляют 7,5 мл раствора для экстракции 0,78 % (м/об) и перемешивают около 1 мин с помощью всгряхивателя. Прибавляют 30 мл раствора для экстракции 0,78 % и перемешивают с помощью мешалки в течение 25 мин до полного растворения.

Доводят pH содержимого колбы до 7,5 ± 0,1 с помощью натрия гидроксида раствора 2,5 М или натрия дигидрофосфата раствора 2 М. Доводят объем содержимого колбы 0,78 % раствором для экстракции (pH 7,6) до метки и перемешивают. Фильтруют содержимое колбы в пробирки через фильтр с размером пор 0,45 мкм, отбрасывая первые 2 мл фильтрата. Раствор хранят при температуре 2-8 °С в течение 2 сут.

Раствор стандартного образца *фолиевой кислоты*. Около 27,0 мг стандартного образца фолиевой кислоты помещают в мерную колбу вместимостью 250 мл. Растворяют в 150 мл 0,78 % раствора для экстракции (pH 7,6) и обрабатывают ультразвуком около 15 мин для растворения. Доводят 0,78 % раствором для экстракции (pH 7,6) до метки и перемешивают.

В мерную колбу вместимостью 100 мл переносят 1,0 мл полученного раствора, доводят 0,78 % раствором для экстракции (pH 7,6) до метки и перемешивают.

Раствор используют свежеприготовленным.

Раствор для определения пригодности хроматографической системы.

Приготовление аналогично приготовлению стандартного раствора. Раствор используют свежеприготовленным.

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

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 150 х 3,9 мм, силикагель октадецилсилильный для хроматографии, 5 мкм; |
| Температура колонки  | 25 °С;  |

Температура образца около 4 °С;

|  |  |
| --- | --- |
| Детектор | 284 нм; |
| Объем пробы | 50 мкл; |
| Скорость потока | 0,8 мл/мин.  |

Время хроматографирования: Около 23 мин

Программа градиентного элюирования:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Время, мин | Подвижная фаза А (%) | Подвижная фаза В (%) |
| 0,00 | 85,0 | 15,0 |
| 3,50 | 85,0 | 15,0 |
| 12,00 | 55,0 | 45,0 |
| 12,01 | 5,0 | 95,0 |
| 17,00 | 5,0 | 95,0 |
| 17,01 | 85,0 | 15,0 |
| 23,00 | 85,0 | 15,0 |

*Примечание* Рекомендуемая программа промывания:

после проведения анализа промывают колонку раствором для промывания А в течение 30 мин при скорости потока 1,0 мл/мин, затем промывают раствором для промывания В в течение 30 мин и наконец смесью ацетонитрил⎯вода в соотношении 50:50 в течение 30 мин.

Хранить колонку следует в смеси ацетонитрил⎯вода 50:50.

Если разделение фолиевой кислоты и вспомогательных веществ недостаточно, допускается вносить изменение в соотношение подвижных фаз. В таком случае должен контролироваться пик чистоты фолиевой кислоты при новых условиях анализа для того, чтобы обеспечить отсутствие перекрывания пика фолиевой кислоты и других пиков.

Проверка пригодности хроматографической системы.

На хроматограмме раствора:

* *эффективность хроматографической колонки* *(N)*, рассчитанная по пику фолиевой кислоты - более 35000 теоретических тарелок;
* *фактор асимметрии для пика* *(AS)* фолиевой кислоты на хроматограмме стандартного раствора - не более 2,0;
* *относительное стандартное отклонение* площадей пиков фолиевой кислоты пяти последовательных инъекций стандартного раствора - не более 2,0 %;
* *сходимость раствора для определения* пригодности хроматографической системы и стандартного раствора (средняя площадь пика, полученная после введения пяти последовательных инъекций стандартного раствора) должна быть в пределах 97,5 % - 102,5 %;

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

Концентрацию фолиевой кислоты в стандартном растворе (мг/мл) вычисляют по формуле:

С=$\frac{ a\_{0} ∙P∙1}{250∙100},$

где: ао - навеска стандартного образца, мг;

 Р - содержание фолиевой кислоты в стандартном образце, долях единицы.

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

Х=$\frac{S\_{1}∙C∙50∙G∙100}{S\_{0}∙ a∙}=\frac{S∙ a\_{0} ∙50∙G∙P∙1}{S\_{0}∙a∙250∙100}$=$\frac{S∙ a\_{0} ∙G∙P∙1}{S\_{0}∙a∙500}=\frac{S∙ a\_{0} ∙G∙P∙N}{S\_{0}∙L∙a∙N\_{0}}$,

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

So - площадь пика фолиевой кислоты на хроматограмме стандартного раствора;

С- концентрация фолиевой кислоты в стандартном растворе, мг/мл;

а - навеска испытуемого образца, г;

G - средняя масса таблеток, г;

L - заявленное количество фолиевой кислоты в одной таблетке, мг

N – коэффициент разведения испытуемого раствора;

N0 - коэффициент разведения при приготовлении основного раствора

стандартного образца фолиевой кислоты.

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

*Примечание*

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

*Раствор для экстракции.* Переносят в колбу подходящей вместимости 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 1000,0 мл метанола и перемешивают до полного растворения.

*Разбавитель.* Переносят в колбу 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) - фосфин гидрохлорида. Прибавляют 1000,0 мл воды и перемешивают до полного растворения.

*Фосфатный раствор 50 мМ.* Переносят в подходящую емкость 27,6±2,8 г натрия дигидрофосфата моногидрата и 9,7 г фосфорной кислоты концентрированной, прибавляют 4000,0 мл воды и перемешивают до полного растворения.

*Рекомендуемый раствор для промывания иглы ВЭЖХ.* метанол⎯вода 500:500.

Подвижная фаза А. 50 мМ фосфатный раствор фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор 0.45 мкм и дегазируют.

Подвижная фаза В. Метанол⎯50 мМ фосфатного раствора 100:400. 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. Прибавляют около 30 мл разбавителя и снова 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 и доводят разбавителем до метки, перемешивают. Фильтруют порцию полученного раствора через фильтр с размером пор 0,45 мкм, отбрасывая первые 2 мл фильтрата. Раствор хранят при температуре 2-8 °С в течение 2 сут.

Раствор стандартного образца *аскорбиновой кислоты*. Около 40,0 мг (точная навеска) стандартного образца аскорбиновой кислоты помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл. Растворяют в разбавителе и доводят разбавителем до метки.

В мерную колбу вместимостью 100 мл переносят 4,0 мл полученного раствора и доводят разбавителем до метки (концентрация около 32 мкг/мл). 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.

*Примечание*

При необходимости вносят изменения в хроматографические условия для достижения соответствия критериям пригодности хроматографической системы. Допускается, при необходимости, внесение изменений в состав подвижной фазы В в пределах 18 % -22 %.

*Раствор сравнения*. Разбавитель.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка: | 150 х 4,6 мм, силикагель октадецилсилильный для хроматографии, 3 мкм 120А;  |
| Температура колонки:  | 35 °С ; |

Температура образца: 5 °С;

|  |  |
| --- | --- |
| Детектор: | 260 нм; |
| Объем пробы: | 10 мкл; |
| Скорость потока: | 0,8 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 |

*Примечание* 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 (N)*, рассчитанная по пику аскорбиновой кислоты - более 2000 теоретических тарелок;

̶ *фактор асимметрии для пика* *(AS)* 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, полученная после введения пяти последовательных инъекций стандартного раствора) и должна быть в пределах ± 2,5 %.

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

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

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

где: S1 - площадь пика аскорбиновой кислоты на хроматограмме

испытуемого раствора;

S0 - площадь пика аскорбиновой кислоты на хроматограмме стандартного раствора;

ао - навеска стандартного образца аскорбиновой кислоты, г;

Р- содержание аскорбиновой кислоты в стандартном образце, %;

а - навеска испытуемого образца, г;

G - средняя масса таблеток, г;

N - коэффициент разведения испытуемого раствора;

N0  - коэффициент разведения при приготовлении основного раствора

стандартного образца аскорбиновой кислоты.

 *Железо, цинк, медь,* ***марганец****.* Определение проводят методом Оптической эмиссионной спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой (ИСП - ОЭС) (ОФС «Атомно-эмиссионная спектрометрия»).

*Примечание* лабораторную стеклянную посуду рекомендуется предварительно ополоснуть азотной кислотой для удаления возможных следовых количеств металлов.

*Раствор кислот.* 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. Точную навеску таблеток, эквивалентную 80,0 мг железа, 40,0 мг цинка, 8,0 мг меди, 8,0 мг марганца, помещают в лабораторный стакан вместимостью 250 мл или аналогичную емкость и прибавляют 50 мл раствора кислот. Лабораторный стакан помещают на электрическую плитку, нагретую до температуры около 60 °С, и накрывают часовым стеклом. После того, как таблетки полностью распадутся, осторожно нагревают содержимое стакана и дигерируют в течение около 45 мин, постоянно помешивая содержимое стакана, вращая на плитке и не доводя до кипения. Если содержимое начинает кипеть, снимают стакан с плитки. Как только кипение прекращается, снова ставят стакан на плитку.

Примечание следует прекратить помешивать содержимое за 10 мин до окончания времени дигерирования.

Прибавляют 50 мл раствора кислот в лабораторный стакан и продолжают дигерирование на электрической плитке при температуре около 60 °С в течение еще 45 мин. Общий объем на двух стадиях дигерирования должен составлять примерно 100 мл.

Еще теплый супернатант переносят в мерную колбу вместимостью 200 мл, пропустив его через бумажный беззольный фильтр 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 водой до метки и перемешивают. Раствор хранят при температуре 15-25 °С в течение 6 сут.

Испытуемый раствор. В мерную колбу вместимостью 200 мл помещают 3,0 мл исходного испытуемого раствора, доводят объем водой до метки и перемешивают. Раствор хранят при температуре 15-25 °С в течение 6 сут.

Стандартные растворы сравнения.

*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.*

*Примечание* 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.

*Примечание* допускается приготовление разных объемов стандартных растворов при условии сохранения заданной концентрации минералов.

*Исходный стандартный раствор.*

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

|  |  |
| --- | --- |
| Элемент | Объем стандартного раствора сравнения (мл) |
| 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 суток.

Стандартные растворы минералов.

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

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

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

 Стандартный раствор М4. В мерную колбу вместимостью 200 мл помещают 20,0 мл исходного стандартного раствора, прибавляют 0,125 мл раствора кислот, доводят объем полученного раствора водой до метки, перемешивают. Стандартные растворы M1, 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) |
| M1 | М2 | М3 | М4 |
| Медь | 0,12 | 0,48 | 0,96 | 2,4 |
| Железо | 1,0 | 4,0 | 8,00 | 20,0 |
| Марганец | 0,26 | 1,04 | 2,08 | 5,2 |
| Цинк | 0,8 | 3,2 | 6,40 | 16,0 |

Контрольный исходный стандартный раствор.

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

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

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

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

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

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

Контрольный раствор. В мерную колбу вместимостью 200 мл помещают 1,5 мл раствора кислот, 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: | 3 л/мин |  |
| Поток в пламени: | 15,0 л/мин |  |
| Режим считывания: | Радиальный |  |
| Длительность интегрирования: | Автоматически |  |
| Длины волн эмиссии: | Медь | 324,754 |
|  | Железо | 238,204 |
|  | Марганец | 257,610 |
|  | Цинк | 213,857 |

1. Включают прибор.
2. Устанавливают параметры согласно описанию в разделе «Рекомендуемые рабочие условия».
3. Стабилизируют прибор с помощью «холостой пробы» в течение как минимум 15 мин перед проведением анализа.
4. Калибруют прибор с помощью контрольного раствора и стандартных растворов М1, М2, М3, М4, а затем проводят анализ испытуемого раствора.

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

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.

* *относительное стандартное отклонение* интенсивности пяти повторностей для каждого стандартного раствора минералов (M1, М2, М3, М4) - не более 5,0%;
* *коэффициент линейности (R2)* - не менее 0,99, а коэффициент корреляции (R) - не менее 0,995;
* *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 (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;

I- отсекаемый отрезок калибровочной кривой для каждого минерала;

b- наклон калибровочной кривой для каждого минерала.

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

Х=$\frac{C∙200∙200∙100}{N∙1000000∙3}$=$\frac{C∙4}{N∙3},$

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

 калибровочной кривой (мкг/мл);

N - количество таблеток для анализа.

 Хром, селен. Определение проводят методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (ИСП-МС) (ОФС «Масс-спектрометрия с индуктивно связанной плазмой»).

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

*Хлористоводородная кислота разведенная.* Около 200 мл воды помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, прибавляют 730 мл хлористоводородной кислоты 37 % и доводят объем раствора водой до метки, перемешивают. Раствор хранят при температуре 15-25 °С в течение 1 мес.

*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 и доводят объем водой до метки, перемешивают. Раствор хранят при температуре 15-25 °С в течение 1 мес.

*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.

Исходный испытуемый раствор. Точную навеску порошка измельченных таблеток эквивалентную 28,5 мкг хрома и 35,7 мкг селена взвешивают и переносят в пробирку для разложения. Прибавляют в пробирку 4,0 мл хлористоводородной кислоты разведенной и 8,0 мл азотной кислоты 65 %.

Проводят процесс разложения при температуре 110 °С в течение 30 мин, используя систему для разложения (уже включенную и настроенную).

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. 1,0 мл исходного испытуемого раствора переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора разбавителем до метки и перемешивают. Раствор хранят при температуре 15-25 °С в течение 7 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.

*Примечание* 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 ppb).* В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 500 мкл многоэлементного стандартного раствора и доводят объем раствора разбавителем до метки, перемешивают.

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

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

*Стандартный раствор М4, концентрация 5 мкг/л (5 ppb).* В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 2500 мкл стандартного раствора М; доводят объем раствора разбавителем до метки и перемешивают.

Растворы используют свежеприготовленными.

Контрольный стандартный раствор.

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

Раствор внутренних стандартов для селена и хрома.

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

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. Раствор хранят при температуре 15-25 °С в течение 1 мес.

Данный раствор добавляется автоматически во время инструментального анализа.

Контрольный раствор. 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 «холостой 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.

Рекомендованная последовательность проведения анализа на приборе: контрольный раствор, калибровочные стандартные растворы (М4, М3 М2, M1), контрольный стандартный раствор, контрольный раствор, испытуемые растворы (максимум 6 образцов), контрольный раствор, контрольный стандартный раствор.

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 контрольного раствора.

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) рассчитывается непосредственно с помощью программного обеспечения или вручную, используя следующую формулу:

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=$\frac{С∙G∙50∙50∙100}{a∙1∙1000000}=\frac{С∙G}{a∙4}$,

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

 калибровочной кривой (мкг/л);

а - навеска испытуемого образца, г;

G - средняя масса таблетки, г.

 Йод. Определение проводят методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (ИСП-МС) (ОФС «Масс-спектрометрия с индуктивно связанной плазмой»).

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

*Примечание* Раствор аммония гидроксида данной концентрации может быть приготовлен из раствора аммония гидроксида другой концентрации.

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

*Аммония гидроксида раствор 0,5 %.* Около 200 мл воды милли-Q переносят в мерную колбу вместимостью 1000 мл, прибавляют 15,5 мл 32 % раствора аммония гидроксида и доводят объем раствора водой милли-Q до метки, 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 таблеток помещают в центрифужную пробирку вместимостью 50 мл. Прибавляют 40,0 мл аммония гидроксида раствора 0,5 %, перемешивают с помощью встряхивателя в течение около 20 с для смачивания и диспергирования образца. Пробирку нагревают на ультразвуковой бане при 70 ± 5 °С в течение 20 мин, помешивают с помощью встряхивателя около 20 с и охлаждают до температуры 15-25 °С.

Затем пробирку 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 и доводят объем содержимого колбы аммония гидроксида раствором 0,5 % до метки, перемешивают.

Стандартные растворы.

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

Исходный стандартный раствор (концентрация 20 мкг/мг). В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 1,0 мл стандартного раствора калия йодида с концентрацией ионов йода 1000 мг/л, доводят объем раствора аммония гидроксида раствором 0,5 % до метки и перемешивают.

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

Калибровочные стандартные растворы.

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

Стандартный раствор М2, концентрация йода 25 мкг /л (ppb). В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 1250 мкл исходного стандартного раствора, доводят объем раствора аммония гидроксида раствором 0,5 % до метки и перемешивают.

Стандартный раствор М3, концентрация йода 50 мкг/л (ррb). В мерную 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 йода 25 мкг/л (ррb)).

Для приготовления раствора используют калия йодид ISO, или стандартного раствора калия йодида с концентрацией ионов йодида 1000 мг/л .

Приготовление контрольного стандартного раствора, используя калия йодид ISO.

Стандартный раствор калия йодида, концентрация йода 2000 мкг /мл. Перед использованием 1 г калия йодида высушивают в сушильном шкафу при 105 °С в течение 3 часов, затем переносят в эксикатор и охлаждают до температуры 15–25 °С. Около 131,00 мг (точная навеска) калия йодида помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют и доводят аммония гидроксида раствором 0,5 % объем раствора до метки, 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, доводят объем раствора аммония гидроксида раствором 0,5 % до метки и 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 с концентрацией теллура 1000 мг/л, доводят объем раствора аммония гидроксида раствором 0,5 % до метки и перемешивают. Раствор хранят при температуре 15 - 25 °С в течение 1 мес.

*Примечание* раствор внутреннего стандарта используют только для контроля

стабильности прибора.

Данный раствор добавляется автоматически во время инструментального анализа.

Контрольный раствор. 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.

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

*Примечание* Следует убедиться перед началом анализа, что сигнал внутреннего стандарта стал стабильным.

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

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 контрольного раствора.

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

Концентрация йода в испытуемом растворе (С, мкг/л) рассчитывается непосредственно с помощью программного обеспечения или вручную, используя следующую формулу:

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

Х=$\frac{С∙G∙40∙50∙100}{a∙0,5∙1000000}=\frac{С∙G}{a∙2,5}$,

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

 калибровочной кривой (мкг/л);

а - навеска испытуемого образца, г;

G- средняя масса таблетки, г;

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