**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

|  |  |
| --- | --- |
| **Аскорбиновая кислота + Кальция пантотенат + Колекальциферол + Никотинамид + Пиридоксина гидрохлорид + Ретинола пальмитат + Рибофлавин + Тиамина нитрат + альфа Токоферола ацетат + Цианокобаламин, таблетки**  ***Acidum ascorbicum + Calcium pantotenas + Colecalciferolum +* *Nicotinamidum + Pyridocxini hydrochloridum + Retinoli palmitas+ Riboflavinum + Thiamini nitras + a-Tocopheroli acetas + Cyanocobalaminum, tabulettae*** | **ФС**  **Вводится впервые** |

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

Настоящая фармакопейная статья распространяется на лекарственный препарат Аскорбиновая кислота + Кальция пантотенат + Колекальциферол + Никотинамид + Пиридоксина гидрохлорид + Ретинола пальмитат + Рибофлавин + Тиамина нитрат + альфа Токоферола ацетат + Цианокобаламин, 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:

̶ аскорбиновая кислота C6H8O6 – не менее 90 % и не более 150 %;

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

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

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

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

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

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

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

̶ альфа – Токоферола ацетат С31Н52О3 –не менее 90 % и не более 150 %.

̶ цианокобаламин C63H88CoN14O14P не менее 1,6 мкг на среднюю массу таблетки

Описание. Содержание раздела приводится в соответствии с ОФС «Лекарственные формы», 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 должно соответствовать времени удерживания пиков *ретинола пальмитата*, колекальциферола, альфа-токоферола ацетата, *тиамина нитрата, а*скорбиновой кислоты, рибофлавина, пиридоксина гидрохлорида, никотинамида, *кальция пантотената*  на хроматограммах соответствующих растворов стандартных образцов или стандартных растворов.

*Масс-спектрометрия с индуктивно связанной плазмой.* Масс-спектр стандартного раствора кобальта (Со), при массовом числе (AMU) 59 должен иметь отклик, соответствующий спектру испытуемого раствора (раздел «Количественное определение» Цианокобаламин).

**Однородность массы.** Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Однородность массы дозированных лекарственных форм».

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

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

**Количественное определение**

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

*Растворитель 1*: эфир.

*Растворитель:* эфир⎯ацетонитрил 10:90.

*Подвижная фаза*: градиентное элюирование

*Подвижная фаза А*: вода

*Подвижная фаза* В: ацетонитрил

*Испытуемый раствор* готовят в двух повторностях.

*Испытуемый раствор ретинола 150 МЕ/мл и а-токоферола ацетата 500 мкг/мл.* Точную навеску целых таблеток, соответствующую около 8,25 мг (15000 МЕ) ретинола пальмитата и 50,0 мг α-токоферола ацетата помещают в подходящую колбу Эрленмейера (например, вместимостью 300 мл), прибавляют 100 мл хлористоводородной кислоты раствора 0,2 % и 100 мл растворителя 1 (используя мерную колбу), перемешивают на магнитной мешалке в течение 30 мин. Корректируют температуру раствора до 15-25 °С и оставляют раствор на 20 мин. В результате получают двухфазный раствор, где верхняя фаза - органическая (эфир) и нижняя фаза - водная (в нижней части верхней (органической) фазы может быть осадок нерастворенного плацебо\*). Затем медленно и аккуратно переносят (декантируют) около 10 мл верхней фазы в подходящую центрифужную пробирку и центрифугируют при 3500 об/мин в течение около 10 мин. Прозрачный супернатант является испытуемым раствором 1.

\*Если нерастворенное плацебо не оседает в нижней части верхней (органической) фазы, граница между органической и водной фазами не может быть четко определена. Несмотря на это продолжают приготовление, так как нерастворенное плацебо седиментирует при центрифугировании.

*Испытуемый раствор 15 МЕ/мл ретинола и 50 мкг/мл а-токоферола.* В мерную колбу вместимостью 20 мл помещают 2,0 мл испытуемого раствора ретинола 150 МЕ/мл и а-токоферола ацетата 500 мкг/мл, доводят объем раствора ацетонитрилом до метки и перемешивают.

Испытуемый раствор хранят в хроматографическом флаконе в автосамплере при температуре 25 °С, в защищенном от света месте в течение 34 ч.

Стандартные образцы выдерживают при комнатной температуре и гомогенизируют перед взвешиванием.

Анализ проводят в защищенном от света месте и используют мерные колбы из темного стекла.

Используют крышки хроматографических флаконов с септами без щелей.

*Раствор стандартного образца ретинола пальмитата около 3000 МЕ/мл.* Около 86,0 мг (точная навеска) стандартного образца ретинола пальмитата, содержащего около 150000 ME ретинола, помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, немедленно прибавляют растворитель 1 до около 75 % объема мерной колбы и полностью растворяют стандарт. Доводят объем раствора растворителем 1 до метки и перемешивают.

*Стандартный раствор 150 МЕ/мл ретинола и 500 мкг/мл а-токоферола ацетата.* Около 50,0 мг (точная навеска) стандартного образца а-токоферола ацетата и 5,0 мл раствора стандартного образца ретинола пальмитатапомещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют растворитель 1 до 75 % объема мерной колбы и полностью растворяют стандарт, доводят объем раствора растворителем 1 до метки и перемешивают.

В подходящую колбу Эрленмейера (вместимостью 300 мл), помещают (используя мерную колбу) 100 мл хлористоводородной кислоты раствора 0,2 % прибавляют все содержимое стандартного раствора и перемешивают на магнитной мешалке в течение 30 мин. Корректируют температуру раствора до 15-25 °С и оставляют раствор на 10 мин. В результате получают двухфазный раствор, где верхняя фаза - органическая (эфир) и нижняя фаза - водная. Затем медленно и аккуратно переносят (декантируют) около 10 мл верхней фазы в подходящую центрифужную пробирку и центрифугируют при 3500 об/мин в течение около 10 мин. Прозрачный супернатант является стандартным раствором (концентрация: около 150 МЕ/мл ретинола и 500 мкг/мл а-токоферола ацетата).

В мерную колбу вместимостью 20 мл помещают 2,0 мл стандартного раствора концентрации около 150 МЕ/мл ретинола и 500 мкг/мл а-токоферола ацетата), доводят объем раствора ацетонитрилом до метки и перемешивают (концентрация: около 15 МЕ/мл ретинола и 50 мкг/мл а-токоферола ацетата).

Стандартный раствор хранят в хроматографическом флаконе в автосамплере при температуре 25 °С, в защищенном от света месте в течение 21 ч.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 150 х 4,6 мм силикагель октадецилсилильный для хроматографии, 5 мкм; |
| Температура колонки | 40 °С; |
| Температура образца | 25 °С; |
| Детектор | УЭФ, 280 нм; |
| Объем пробы | 50 мкл; |
| Скорость потока | 1,5 мл/мин; |
| Промывка иглы | Ацетонитрилом. |

При необходимости слегка корректируют температуру колонки (35-40 °С) для обеспечения пригодности хроматографической системы.

Время хроматографирования около 18 мин + 4 мин для уравновешивания системы.

Время удерживания пика альфа-токоферола ацетата около 9 мин; ретинола пальмитата около 15 мин.

Подвижная фаза: градиентное элюирование

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Время, мин | Подвижная фаза А, % | Подвижная фаза В, % |
| 0 | 10 | 90 |
| 3 | 10 | 90 |
| 15 | 0 | 100 |
| 18 | 0 | 100 | время уравновешивания хроматографической системы |
| 18,1 | 10 | 90 |
| 22 | 10 | 90 |

Хроматографируют стандартный и испытуемый растворы.

*Проверка пригодности хроматографической системы*

В приведенную в состояние равновесия хроматографическую систему вводят растворитель, затем стандартный раствор.

На хроматограмме раствора:

* *относительное стандартное отклонение* площадей пика ретинола пальмитата не более 2 % и а-токоферола ацетата не более 2 % (5 введений);
* *фактор асимметрии* *(AS)* пика ретинола пальмитата не менее 0,9 и не более 1,5 а-токоферола ацетата не более 1,5;
* *эффективность хроматографической колонки (N)* по пику ретинола пальмитата не менее 40000 теоретических тарелок

а-токоферола ацетата не менее 10000 теоретических тарелок;

* *разрешение (R)* между пиком а-токоферола ацетата и пиком ретинола пальмитата не менее 10.

После проверки пригодности хроматографической системы проводят калибровку для пика ретинола пальмитата и а-токоферола ацетата, используя метод внешнего стандарта. Затем вводят испытуемый раствор.

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

Х==

где: S - площадь пика ретинола пальмитата на хроматограмме испытуемого раствора;

S0 - площадь пика ретинола пальмитата на хроматограмме стандартного

раствора;

a0- навеска стандартного образца ретинола пальмитата, мг;

a1 - навеска порошка для приготовления испытуемого раствора, мг;

А – активность ретинола в стандартном образце ретинола пальмитата,

МЕ/мг, 1819,3 МЕ/мг;

G- средняя масса таблетки, мг;

P - содержание ретинола пальмитата в стандартном образце ретинола

пальмитата мг/мг;

L - заявленное количества ретинола пальмитата в одной таблетке, (1500 МЕ);

Содержание а-токоферола ацетата С31Н52О3 в процентах от заявленного количества (X), вычисляют по формуле:

Х==

где: S - площадь пика а-токоферола ацетата на хроматограмме испытуемого

раствора;

S0 - средняя площадь пика а-токоферола ацетата на хроматограммах

стандартного раствора;

ао - навеска стандартного образца а-токоферола ацетата, мг;

Р - содержание а-токоферола ацетата в стандартном образце, %

G - средняя масса таблетки, мг;

а - навеска образца, мг;

L - заявленное количество а-токоферола ацетата в таблетке,

(5 мг).

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

Анализ проводят в защищенном от света месте.

*Подвижная фаза А.* Метанол

*Подвижная фаза В*. Вода

*Подвижная фаза В⎯Подвижная фаза А* (8:92).

*Испытуемый раствор.* Испытуемый раствор готовят в двух повторностях. Точную навеску порошка измельченных таблеток, соответствующую по 0,4 мг колекальциферола помещают в колбу Эрленмейера вместимостью 100 мл. Прибавляют 10 мл диметилсульфоксида и 50 мл гексана. Осторожно перемешивают и нагревают при 60 °С в течение около 45 мин при постоянном легком взбалтывании. Температуру раствора охлаждают до 15-25 °С и встряхивают на шейкере в течение 15 мин. Оставляют раствор на некоторое время и затем переносят верхний гексановый слой через фильтр для фазового разделения в колбу ротационного испарителя вместимостью 250 мл. К остатку в колбе Эрленмейера (диметилсульфоксидовый слой) прибавляют 30 мл гексана и встряхивают на шейкере в течение около 15 мин. И снова переносят верхний гексановый слой в колбу ротационного испарителя. Экстракцию повторяют дважды с 30 мл гексана. Фильтр для фазового разделения промывают приблизительно 10 мл гексана в колбу ротационного испарителя. Содержимое колбы ротационного испарителя выпаривают досуха на ротационном испарителе при 40 °С. Сухой остаток растворяют в 5,0 мл метанола и фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. Прозрачный фильтрат является испытуемым раствором (концентрация колекальциферола около 80 МЕ/мл).

Испытуемый раствор хранят в хроматографическом флаконе при температуре 15-25 °С в течение 30 ч.

*Раствор стандартного образца колекальциферола 8000 МЕ/мл или 200 мкг/мл.* Около 10,0 мг (точная навеска) стандартного образца колекальциферола, содержащего около 400000 ME колекальциферола, помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в метаноле, доводят объем раствора метанолом до метки и перемешивают.

В мерную колбу вместимостью 20,0 мл помещают 1,0 мл раствора стандартного образца колекальциферола 8000 МЕ/млдоводят объем раствора метанолом до метки и перемешивают (концентрация 400 МЕ/мл или 10 мкг/мл).

В колбу Эрленмейера вместимостью 100 мл, помещают 1,0 раствора стандатного образца концентрация 400 МЕ/мл или 10 мкг/мл прибавляют 10 мл диметилсульфоксида и 50 мл гексана. Осторожно перемешивают и нагревают при 60 °С в течение около 45 мин при постоянном легком взбалтывании. Раствор охлаждают до температуры 15-25 °С и встряхивают на шейкере в течение около 15 мин. Оставляют раствор на некоторое время и затем переносят верхний гексановый слой через фильтр для фазового разделения в колбу ротационного испарителя вместимостью 250 мл. К остатку в колбе Эрленмейера (диметилсульфоксидовый слой) прибавляют 30 мл гексана и встряхивают на шейкере в течение около 15 мин. И снова переносят верхний гексановый слой в колбу ротационного испарителя. Экстракцию повторяют дважды с 30 мл гексана. Фильтр для фазового разделения промывают приблизительно 10 мл гексана в колбу ротационного испарителя. Содержимое колбы ротационного испарителя выпаривают досуха на ротационном испарителе при 40 °С. Сухой остаток растворяют в 5,0 мл метанола и фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. Прозрачный фильтрат является раствором стандартного образца (концентрация колекальциферола: около 80 МЕ/мл).

Раствор СО хранят в хроматографическом флаконе при температуре 15-25 °С в течение 33 ч.

*Контрольный раствор*. Готовят без испытуемого образца аналогично методике приготовления испытуемого раствора.

*Хроматографические условия.*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка: | 200 х 2,1 мм, силикагель октадецилсилильный эндкепированный для хроматографии, 5 мкм; |
| Температура колонки: | 35 °С; |
| Температура образца: | 25 °С; |
| Детектор: | УФ, 265 нм; |
| Объем пробы: | 20 мкл; |
| Скорость потока: | 0,8 мл/мин. |

Время хроматографирования: около 50 мин.

Время удерживания пика колекальциферола: около 4 мин

В приведенную в состояние равновесия хроматографическую систему вводят растворитель, затем стандартный раствор.

На хроматограмме раствора:

* *относительное стандартное отклонение* площадей пика колекальциферола не более 2,0 % (5 введений);
* *фактор асимметрии (*As*) пика* колекальциферола не более 1,5;
* *эффективность хроматографической колонки (N)*, рассчитанная по пику колекальциферола, не менее 1200 теоретических тарелок.

Затем вводят испытуемый раствор, регистрируют хроматограммы.

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

Х=

где: S - площадь пика колекальциферола на хроматограмме испытуемого

раствора;

So - площадь пика колекальциферола на хроматограммах раствора

стандартного образца;

ао - навеска стандартного образца колекальциферола, мг;

Р - содержание колекальцирола в стандартном образце, %;

А - активность колекальциферола в стандартном образце, МЕ/мг, 40000

МЕ/ мг ( 1 мг колекальциферола);

G - средняя масса таблетки, мг;

а - навеска образца, мг;

L - заявленное количество колекальциферола в таблетке, 100 МЕ.

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

*Подвижная фаза А.* Фосфорной кислоты раствор 0,25 %.

*Подвижная фаза В.* Ацетонитрил⎯Метанол⎯Вода 150:150:700.

*Растворитель*. Фосфорной кислоты раствор 0,1 %.

*Испытуемый раствор*. Точную навеску порошка измельченных таблеток, эквивалентную по содержанию около 5,0 мг тиамина нитрата, 6,0 мг рибофлавина, 10,0 пиридоксина гидрохлорида, 50,0 мг никотинамида и 800,0 мг аскорбиновой кислоты и 50,0 мг кальция пантотената помещают в подходящую колбу Эрленмейера или в мерную колбу вместимостью 1000 мл, прибавляют 500 мл растворителя (используя мерную колбу), перемешивают на магнитной мешалке не менее 30 мин или до полного распада таблеток. Часть раствора фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм, отбрасывая первые несколько капель фильтрата. Прозрачный фильтрат является испытуемым раствором (концентрация: около 0,01 мг/мл тиамина нитрата, 0,1 мг/мл никотинамида, 1,6 мг/мл аскорбиновой кислоты, 0,02 мг/мл пиридоксина гидрохлорида, 0,1 мг/мл кальция пантотената и 0,012 мг/мл рибофлавина).

Испытуемый раствор хранят в хроматографическом флаконе в автосамплере при температуре 7 °С, в защищенном от света месте в течение 29 ч.

*Испытуемый раствор С.* В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 2,5 мл испытуемого раствора, доводят объем раствора растворителем до метки и перемешивают (концентрация аскорбиновой кислоты около 0,08 мг/мл).

Испытуемый раствор С хранят в хроматографическом флаконе в автосамплере при температуре 7 °С, в защищенном от света месте в течение 12 ч.

*Контрольный раствор.* Готовят без испытуемого образца аналогично методике приготовления испытуемого раствора.

*Стандартный раствор.* Около 5,0 мг (точная навеска) стандартного образца тиамина нитрата, 50,0 мг (точная навеска) стандартного образца никотинамида, 40,0 мг (точная навеска) стандартного образца аскорбиновой кислоты, 10,0 мг (точная навеска) стандартного образца пиридоксина гидрохлорида, 50,0 мг (точная навеска) стандартного образца кальция пантотената и 6,0 мг (точная навеска) стандартного образца рибофлавина помещают в мерную колбу вместимостью 500 мл, прибавляют растворитель до около 75 % объема мерной колбы и обрабатывают ультразвуком в течение около 10 мин или до полного растворения стандартных образцов (несколько раз перемешивают при обработке ультразвуком). Доводят объем раствора растворителем до метки и перемешивают (концентрация: около 0,01 мг/мл тиамина нитрата, 0,1 мг/мл никотинамида, 0,08 мг/мл аскорбиновой кислоты, 0,02 мг/мл пиридоксина гидрохлорида, 0,1 мг/мл кальция пантотената и 0,012 мг/мл рибофлавина).

Стандартный раствор хранят в хроматографическом флаконе в автосамплере при температуре 7 °С, в защищенном от света месте в течение 10 ч.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 250 х 4,6 мм, силикагель  октадецилсилильный эндкепированный для хроматографии, 5 мкм; |
| Температура колонки | 40 °С; |
| Температура образца | 7 °С; |
| Детектор | УФ, 245 нм для тиамина, никотинамида и аскорбиновой кислоты; | |
|  | УФ, 290 нм для пиридоксина; | |
|  | УФ, 210 нм для пантотеновой кислоты и рибофлавина; | |
| Объем пробы | 20 мкл; | |
| Иглу промывают раствором ацетонитрил⎯вода 10:90 способом, предусмотренным для прибора; | | |
| Скорость потока | 1,5 мл/мин. | |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Время  (t мин) | подвижная фаза А (%) | подвижная фаза В (%) |  |
| 0 | 100 | 0 |
| 3 | 100 | 0 |
| 10 | 0 | 100 |
| 14 | 0 | 100 |
| 14,1 | 100 | 0 | время уравновешивания хроматографической системы |
| 20 | 100 | 0 |

|  |  |
| --- | --- |
| время (мин) | длина волны (нм) |
| 0 | 245 |
| 5\* | 290 |
| 8\* | 210 |

\*Переключают длину волны согласно временам удерживания (Rt) пиков пиридоксина и пантотеновой кислоты.

Время хроматографирования: 14 мин плюс дополнительно 6 мин на уравновешивания хроматографической системы.

*Относительное время удерживания*: тиамина около 2,1 мин; никотинамида около 2,8 мин; аскорбиновой кислоты около 3,5 мин; пиридоксина около 6,6 мин; пантотеновой кислоты около 9,8 мин; рибофлавина около 12,7 мин.

В приведенную в состояние равновесия хроматографическую систему вводят растворитель, затем вводят стандартный раствор.

На хроматограмме раствора

* *относительное стандартное отклонение* площадей пиков тиамина рибофлавина, пиридоксина, никотинамида, аскорбиновой кислоты, пантотеновой кислоты не более 2,0 % (5 введений);
* *фактор асимметрии* (As) *пика* тиамина не менее 0,9 и не более 2,0;

никотинамида, аскорбиновой кислоты, пиридоксина, рибофлавина, пантотеновой кислоты не более 1,5;

* *эффективность хроматографической колонки* (N) рассчитанная по пику тиамина не менее 3000 теоретических тарелок,

никотинамида, аскорбиновой кислоты не менее 7000 теоретических тарелок;

пиридоксина не менее 15000 теоретических тарелок,

* *разрешение* (R) между пиком никотинамида и пиком аскорбиновой кислоты не менее 2,5.

После проверки пригодности хроматографической системы проводят калибровку для пика тиамина нитрата, никотинамида, аскорбиновой кислоты, пиридоксина гидрохлорида, кальция пантотената и рибофлавина, используя метод внешнего стандарта. Затем вводят испытуемый раствор С и испытуемый раствор.

Содержание тиамина нитрата C12H17N4OSˑNO3, в процентах от заявленного количества, как среднее значение двух повторностей (Х) вычисляют по формуле:

Х=,

где: S - площадь пика тиамина нитрата на хроматограмме испытуемого

раствора;

So - площадь пика тиамина нитрата на хроматограмме стандартного

раствора;

ао - навеска стандартного образца тиамина нитрата, мг;

Р - содержание тиамина нитрата в стандартном образце, %;

а - навеска испытуемого образца, мг;

G - средняя масса таблеток, мг;

L - заявленное количество тиамина в одной таблетке, мг ( тиамина

нитрата 0,5 мг)

Содержание никотинамида С6Н6N2O, пиридоксина гидрохлорида C8H11NO3 ·HCI, кальция пантотената C18H32CaN2O10 и рибофлавина C17H20N4O6 в процентах от заявленного количества, как среднее значение двух повторностей (Х), вычисляют по формуле:

Х=,

где: S - площадь пика никотинамида, пиридоксина гидрохлорида, кальция

пантотената и рибофлавина на хроматограмме испытуемого раствора;

So - площадь пика никотинамида, (пиридоксина гидрохлорида, кальция пантотената и рибофлавина) на хроматограмме стандартного раствора;

ао - навеска стандартного образца никотинамида, (пиридоксина гидрохлорида, кальция пантотената и рибофлавина), мг;

Р - содержание никотинамида, пиридоксина гидрохлорида, кальция

пантотената и рибофлавина на хроматограмме испытуемого раствора;

мг/мг;

а - навеска испытуемого образца, мг;

L - заявленное количество никотинамида, пиридоксина гидрохлорида,

кальция пантотената и рибофлавина в одной таблетке, мг;

100 - пересчет в проценты.

Содержание аскорбиновой кислоты C6H8O в процентах от заявленного количества, как среднее значение двух повторностей (Х), вычисляют по формуле:

Х=,

где: S - площадь пика аскорбиновой кислоты на хроматограмме

испытуемого раствора С;

So - площадь пика аскорбиновой кислоты на хроматограмме

стандартного раствора;

ао - навеска стандартного образца аскорбиновой кислоты, мг;

Р - содержание аскорбиновой кислоты в стандартном образце, мг/мг;

а - навеска испытуемого образца, мг;

G - средняя масса таблетки, мг;

L - заявленное количество аскорбиновой кислоты в одной таблетке, мг

(80 мг).

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

*Раствор для промывания -* азотной кислоты раствор 10 %.

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

*Испытуемый раствор.* Точную навеску гомогенизированного образца препарата в двух повторностях эквивалентную по содержанию 0,83 мкг цианокобаламина помещают в реакционные сосуды или во флаконы и прибавляют около 5,0 мл азотной кислоты концентрированной и 0,5 мл водорода пероксида. Закрытые реакционные сосуды или флаконы помещают в микроволновую печь и разлагают образец. (Используют программу микроволнового разложения указанную ниже или другую соответствующую программу в соответствии с инструкциями производителя.) После завершения разложения раствор охлаждают и количественно переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора водой для хроматографии до метки и перемешивают.

При необходимости испытуемый раствор фильтруют через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм, фильтрат используют для измерений.

Испытуемый раствор хранят при температуре 15-25 °С в течение 43 ч.

*Контрольный раствор* *для испытуемого образца* готовят по этой же методике без испытуемого вещества.

Рекомендуемая программа микроволнового разложения:

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

Растворы для построения калибровочной кривой:

Основной стандартный раствор кобальта (1,0 мг/л). Во флакон вместимостью 50 мл помещают 50 мкл стандартного раствора кобальта (1000 мг/л) и 5 мл азотной кислоты концентрированной, доводят объем раствора водой для хроматографии до метки и перемешивают.

Контрольный стандартный раствор. Во флакон вместимостью 50 мл помещают 2,5 мл азотной кислоты концентрированной доводят объем раствора водой для хроматографирования до метки и перемешивают.

Рабочий стандартный раствор кобальта (0,1 мкг/л). Во флакон вместимостью 50 мл помещают 5 мкл основного стандартного раствора кобальта (10 мкг/л) и 5 мл азотной кислоты концентрированной, доводят объем раствора водой для хроматографирования до метки и перемешивают.

Рабочий стандартный раствор кобальта (1,0 мкг/л). Во флакон вместимостью 50 мл помещают 50 мкл основного стандартного раствора кобальта (10 мкг/л)и 5 мл азотной кислоты концентрированной доводят объем раствора водой для хроматографирования до метки и перемешивают.

Рабочий стандартный раствор кобальта (2,0 мкг/л). В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 100 мкл *о*сновного стандартного раствора кобальта (10 мкг/л) и 5 мл азотной кислоты концентрированной доводят объем раствора водой для хроматографирования до метки и перемешивают.

Контрольный стандартный раствор кобальта (1,0 мкг/л). В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 50 мкл стандартного раствор кобальта (1000 мг/л) и 5 мл азотной кислоты концентрированной доводят объем раствора водой для хроматографирования до метки и перемешивают.

Во флакон вместимостью 50 мл помещают 50 мкл *к*онтрольного стандартного раствора кобальта (1,0 мкг/л) и 5 мл азотной кислоты концентрированной, доводят объем раствора водой для хроматографирования до метки и перемешивают.

*Рекомендуемые параметры (для масс-спектрометра):*

Мощность плазмы: 1600 Вт

Газ-носитель: 1,05 л/мин

Насос распылителя: 0,1 об/сек

Распылитель: концентрический стеклянный,

Распылительная камера: кварцевое стекло, двухходовая

Горелка: кварцевое стекло, диаметр инжектора 2,5 мм

Конус семплера и скиммера: никель

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

стандарт Sc (45)/Нет газа.

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

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

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

На основании измеренного отношения (Стандартный раствор испытуемого вещества/Стандартный раствор внутренного стандарта) рабочих стандартных растворов получают калибровочные кривые для кобальта.

Затем проводят измерение контрольного стандартного раствора кобальта, контрольного раствора для испытуемого образца, а затем испытуемого раствора и соответствующего рабочего стандартного раствора (для определения пригодности, например, рабочего стандартного раствора кобальта 1,0 мкг/л). По калибровочной кривой определяют концентрацию кобальта в образце. Концентрацию кобальта рассчитывают по цианокобаламину с использованием молекулярных масс.

Результат - среднее значение по двум повторностям испытуемой порции.

Критерии премлемости для использования стандартного раствора:

|  |  |
| --- | --- |
| Параметр | Требования |
| Коэффициент корреляции (R) | R ≥ 0,99 |
| Контрольный стандартный раствор кобальта (0,1 мкг/мл) | ±10 % от ожидаемого значения |
| Пригодность система (рабочий стандартный раствор; 1,0 мкг/мл) | ±10 % от предпологаемого значения |

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

Могут быть использованы другие соответствующие методики введения раствора внутреннего стандарта.

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

Х=

где: C1 - концентрация кобальта в испытуемом растворе, мкг/л;

C2 - концентрация кобальта в контрольном испытуемом растворе,

мкг/л;

G - средняя масса таблеток, г;

а - навеска испытуемого образца, г;

1355,37 - молекулярная масса цианокобаламина;

58,93 - атомная масса кобальта.

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

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