**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

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

|  |  |
| --- | --- |
| Аскорбиновая кислота + Кальция пантотенат + Колекальциферол + Никотинамид + Пиридоксина гидрохлорид + Ретинола пальмитат + Рибофлавин + Тиамина нитрат + Фолиевая кислота + Цианокобаламин + Кальций + Фосфор, таблетки  *Acidum ascorbicum + Calcium pantotenas + Colecalciferolum + Nicotinamidum + Pyridocxini hydrochloridum + Retinoli palmitas+ Riboflavinum + Thiamini nitras + Acidum folicum + Cyanocobalaminum + Calcium + Phosphorus, tabulettae* | ФС  Вводится впервые |

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

Настоящая фармакопейная статья распространяется на лекарственный препарат Аскорбиновая кислота + Кальция пантотенат + Колекальциферол + Никотинамид + Пиридоксина гидрохлорид + Ретинола пальмитат + Рибофлавин + Тиамина нитрат + Фолиевая кислота + Цианокобаламин + Кальций + Фосфор, таблетки

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

Препарат содержит от заявленного количества:

̶ 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 %;

̶ фолиевой кислоты C₁₉H₁₉N₇O₆ не менее 80 % и не более 150 %;

̶ цианокобаламин C63H88CoN14O14P не менее 80 %

̶ кальций в виде кальция гидрофосфата CaHPO4 не менее 90 % и не более 125 %;

̶фосфор не менее 90 % и не более 125 %;

Описание. Содержание раздела приводится в соответствии с ОФС «Лекарственные формы», ОФС «Таблетки».

**Подлинность**

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

Время удерживания основных пиков на хроматограммах испытуемых растворов должно соответствовать времени удерживания соответствующих пиков *ретинола пальмитата*, *тиамина гидрохлорида,* рибофлавина, *пиридоксина гидрохлорида,* никотинамида, колекальциферола, *пантотеновой* кислоты, фолиевой кислоты и *аскорбиновой кислоты* на хроматограммах соответствующих растворов стандартных образцов или стандартных растворов.

Спектрофотометрия. УФ-спектр поглощения испытуемого раствора, приготовленного для испытания «Количественное определение. *Фосфор*», при длине волны 750 нм. Определение проводят в соответствии с ОФС «Спектрофотомерия в ультрафиолетовой и видимой областях».

*Масс-спектрометрия с индуктивно связанной плазмой (ИСП-МС).* Определение проводят в соответствии с ОФС «Масс-спектрометрия» Масс-спектр стандартного раствора кобальта (Со), приготовленного для испытания «Количественное определение. Цианокобаламин», должен иметь такой же отклик при массовом числе (AMU) 59, как и спектр испытуемого раствора.

А*томно-абсорбционная спектрометрия*. Спектры поглощения испытуемого и соответствующего стандартного раствора *Кальция* должны иметь максимумы при одних и тех же длинах волн (раздел «Количественное определение») в соответствии с ОФС «Атомно-абсорбционная спектрометрия».

**Однородность массы.** В соответствии с 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

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

*Подвижная фаза А.*  Вода.

*Подвижная фаза В*. Метанол.

*Подвижная фаза А⎯Подвижная фаза В 2:98.*

Подвижную фазу дегазируют любым подходящим способом (ультразвуком или гелием).

Испытуемый раствор. Точную навеску порошка измельченных и гомогеннизированных таблеток, эквивалентную по массе 1,4 мг ретинола пальмитата, помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют метанол до около 75 % объема мерной колбы (после добавления метанола сразу перемешивают во избежание прилипания порошка измельченных таблеток на стенки колбы) и доводят объем раствора метанолом до метки. Обрабатывают ультразвуком 2 раза по 10 мин (несколько раз перемешивают при обработке ультразвуком). Часть суспензии центрифугируют при не менее 3500 об/мин в течение около 10 мин. Прозрачный центрифугат фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. Прозрачный фильтрат является испытуемым раствором (концентрация ретинола пальмитат около 48 МЕ/мл).

Испытуемый раствор стабилен в течение 5 ч при комнатной температуре.

Раствор стандартного образца ретинола польмитата *45 МЕ/мл* . Количество стандартного образца ретинола пальмитата (точная навеска), содержащее около 18000 ME ретинола пальмитата, помещают в мерную колбу вместимостью 20 мл, прибавляют метанол до около 75 % объема мерной колбы и обрабатывают ультразвуком в течение около 30 мин или до полного растворения стандарта (несколько раз перемешивают при обработке ультразвуком). Корректируют температуру раствора до 15-25 °С, доводят объем раствора метанолом до метки и перемешивают.

В мерную колбу вместимостью 20 мл, помещают 1,0 мл раствора стандартного образца 1 доводят объем раствора метанолом до метки и перемешивают.

Раствор стандартного образца стабилен в течение 26 ч при температуре 15-25 °С.

*Хроматографические условия*

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Предколонка | 10 х 4,0 мм силикагель октадецилсилильный для хроматографии, 5 мкм; | | |
| Колонка | | 125 х 4,0 мм силикагель октадецилсилильный для хроматографии, 5 мкм; |
| Температура колонки | | 35 °С; |
| Температура образца: | | 25 °С; |
| Детектор | | спектрофотометрический:  280 нм; |
| Объем пробы | | 20 мкл; |
| Скорость потока: | | 2,0 мл/мин. |

Время хроматографирования: около 9 мин

Время удерживания пика ретинола пальмитата: около 6 мин

Результаты анализа считаются достоверными, если выполняются требования

теста «Проверка пригодности хроматографической системы».

*Проверка пригодности хроматографической системы.*

В приведенную в состояние равновесия хроматографическую систему вводят метанол. Затем вводят раствор стандартного образца, регистрируют хроматограммы.

На хроматограмме раствора стандартного образца ретинола пальмитата:

* *относительное стандартное отклонение* площадей пика ретинола пальмитата не более 2,0 % (5 введений);
* *фактор асимметрии* (As) пика ретинола пальмитата не более 1,8;
* *эффективность хроматографической колонки* (N), рассчитанная по пику ретинола пальмитата, не менее 2500 теоретических тарелок.

После проверки пригодности хроматографической системы проводят калибровку для пика ретинола пальмитата, используя метод внешнего стандарта. Затем вводят испытуемый раствор, регистрируют хроматограммы.

Содержание ретинола пальмитата С36Н60О2 в препаратев процентах от заявленного количества (Х) вычисляют по формуле:

Х=,

где: S - площадь пика ретинола пальмитата на хроматограмме испытуемого

раствора (ИР);

So - средняя площадь пика ретинола пальмитата на хроматограммах раствора стандартного образца;

Со - концентрация ретинола пальмитата в растворе стандартного

образца, МЕ/мл;

C0 =

ао - навеска стандартного образца ретинола пальмитата, мг;

Р - содержание ретинола пальмитата в стандартном образце, мг/мг;

А - активность ретинола пальмитата в стандартном образце ретинола пальмитата, МЕ/мг;

G - средняя масса таблетки, мг;

а - навеска образца, мг;

L - заявленное количество ретинола пальмитата в таблетках, 600 международных единиц.

**Тиамина нитрат, рибофлавин, пиридоксина гидрохлорид, никотинамид и *подлинность аскорбиновой кислоты***

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

Растворитель. Уксусной кислоты раствор 1 %.

*Подвижная фаза А.* В мерную колбу вместимостью 1000 мл, помещают 1,25 г натрия гексансульфоната (или 1,36 г натрия гек- сансульфоната моногидрата), прибавляют 50 мл метанола, 10 мл уксусной кислоты ледяной и 2,0 мл триэтиламина, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

*Подвижная фаза В.* В мерную колбу вместимостью 1000 мл, помещают 1,25 г натрия гексансульфоната (или 1,36 г натрия гек- сансульфоната моногидрата), прибавляют 200 мл метанола, 10 мл уксусной кислоты ледяной и 2,0 мл триэтиламина, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Перед использованием подвижную фазу А и В фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

Испытуемый раствор. Точную навеску порошка измельченных таблеток, эквивалентную по содержанию 1,25 мг тиамина нитрата, 1,5 мг рибофлавина, 1,5 пиридоксина гидрохлорида, 15,0 мг никотинамида и 50 мг аскорбиновой кислоты помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют около 80 мл растворителя и обрабатывают ультразвуком в течение около 10 мин (несколько раз перемешивают при обработке ультразвуком). Охлаждают раствор до 15-25 °С, доводят объем раствора растворителем до метки и перемешивают. Обрабатывают ультразвуком в течение около 20 мин (периодически встряхивая колбу). Охлаждают раствор до 15-25 °С, аликвоту суспензии центрифугируют при не менее 3500 об/мин в течение около 10 мин и фильтруют прозрачный супернатант через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. Прозрачный фильтрат является испытуемым раствором.

(Концентрация в испытуемом растворе тиамина нитрата около 0,0125 мг/мл, рибофлавина около 0,015 мг/мл, никотинамида около 0,15 мг/мл, пиридоксина гидрохлорида около 0,015 мг/мл, 0,5 мг/мл аскорбиновой кислоты). Испытуемый раствор используют свежеприготовленным.

Раствор стандартного образца тиамина нитрата (1,25 мг/мл). Около 12,5 мг (точная навеска) стандартного образца тиамина нитрата помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, растворяют в растворителе, доводят объем раствора растворителем до метки и перемешивают.

r

Раствор стандартного образца рибофлавина (0,06 мг/мл). Около 6 мг (точная навеска) стандартного образца рибофлавина помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в растворителе, доводят объем раствора растворителем до метки и перемешивают.

Раствор стандартного образца пиридоксина гидрохлорида (*1,5 мг/мл*). Около 15,0 мг (точная навеска) стандартного образца пиридоксина гидрохлорида помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, растворяют в растворителе, доводят объем раствора растворителем до метки и перемешивают.

Стандартный раствор. Около 15 мг (точная навеска) стандартного образца никотинамида и около 50 мг (точная навеска) стандартного образца аскорбиновой кислоты помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 1,0 мл раствора стандартного образца тиамина нитрата, 25,0 мл раствора стандартного образца рибофлавина и 1,0 мл раствора стандартного образца пиридоксина гидрохлорида, перемешивают, доводят объем раствора растворителем до метки и перемешивают.

(Концентрация стандартного раствора: около 0,0125 мг/мл тиамина нитрата, около 0,015 мг/мл рибофлавина, около 0,15 мг/мл никотинамида, около 0,015 мг/мл пиридоксина гидрохлорида, около 0,5 мг/мл аскорбиновой кислоты).

Стандартный раствор стабилен в течение 26 ч в хроматографическом флаконе в автосамплере при температуре 15-25 °С.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 250 х 4,0 мм, силикагель  октадецилсилильный эндкепированный для хроматографии, 5 мкм; |
| Температура колонки | 35 °С; |
| Температура образца | 25 °С; |
| Детектор | УФ, 270 нм; | |
| Объем пробы | 20 мкл; | |
| Скорость потока | 1,5 мл/мин. | |

Подвижная фаза: градиентное элюирование

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Время (t, мин) | подвижная фаза А (%) | подвижная фаза В (%) |
| 0 | 100 | 0 |
| 7 | 100 | 0 |
| 9 | 0 | 100 |
| 19 | 0 | 100 |
| 20 | 100 | 0 |
| 23 | 100 | 0 |

Время хроматографирования 20 мин плюс дополнительно 3 мин на уравновешивания хроматографической системы.

Относительное время удерживания: аскорбиновой кислоты около 2 мин; никотинамида около 3 мин; пиридоксина около 8 мин; тиамина около 14 мин; рибофлавина около 17 мин.

*Проверка пригодности хроматографической системы.*

На хроматограммах стандартного раствора тиамина нитрата, рибофлавина, пиридоксина и никотинамида:

*̶ относительное стандартное отклонение* площадей пиков тиамина рибофлавина, пиридоксина, никотинамида не более 2,0 % (5 введений);

* *эффективность хроматографической колонки* (N) рассчитанная по пику

никотинамида, не менее 1500 теоретических тарелок;

пиридоксина не менее 1500 теоретических тарелок, тиамина не менее 15000 теоретических тарелок, рибофлавина не менее 10000 теоретических тарелок;

* *фактор асимметрии (As) пика* никотинамида не более 2,0;
* пиридоксина не более 1,6, тиамина не более 1,6, рибофлавина не более 1,6;
* разрешение (R):
* между пиком никотинамида и пиком пиридоксина не менее 10;
* между пиком пиридоксина и пиком тиамина не менее 15;
* между пиком тиамина и пиком рибофлавина не менее 5.

Затем вводят испытуемый раствор, регистрируют хроматограммы.

Содержание тиамина нитрата C12H17N4OSˑNO3 в препарате в процентах от заявленного количества (X) вычисляют по формуле:

Х=Х=,

где: S1 - площадь пика тиамина гидрохлорид на хроматограмме испытуемого

раствора;

So - площадь пика тиамина гидрохлорид на хроматограмме раствора

стандартного образца;

ао - навеска стандартного образца тиамина гидрохлорида, мг;

Р - содержание тиамина гидрохлорида в стандартном образце в

пересчете на безводное вещество, мг/мг;

V - объем испытуемого раствора, мл;

а - навеска испытуемого образца, мг;

L - заявленное количество тиамина в одной таблетке, мг;

100 - пересчет в проценты.

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

Х==,

где: S1 - площадь пика рибофлавина на хроматограмме испытуемого

раствора;

So - площадь пика рибофлавина на хроматограмме раствора стандартного образца;

ао - навеска стандартного образца рибофлавина, мг;

Р - содержание рибофлавина в стандартном образце в пересчете на сухое вещество, %;

а - навеска испытуемого образца, мг;

L - заявленное количество рибофлавина в одной таблетке, мг;

100 - пересчет в проценты.

Содержание пиридоксина гидрохлорида C8H11NO3 ·HCI в препарате в процентах от заявленного количества (X) вычисляют по формуле:

Х==

где: S1 - площадь пика пиридоксина гидрохлорида на хроматограмме

испытуемого раствора;

So - площадь пика пиридоксина гидрохлорида на хроматограмме

раствора стандартного образца;

ао - навеска стандартного образца пиридоксина гидрохлорида, мг;

Р - содержание пиридоксина гидрохлорида в стандартном образце,

мг/мг;

а - навеска испытуемого образца, мг;

L - заявленное количество пиридоксина в одной таблетке, мг;

100 - пересчет в проценты.

Содержание никотинамида С6Н6N2O в препарате в процентах от заявленного количества (X) вычисляют по формуле:

Х=

где: S1 - площадь пика никотинамида на хроматограмме испытуемого

раствора;

So - площадь пика никотинамида на хроматограмме раствора

стандартного образца;

ао - навеска стандартного образца никотинамида, в мг;

Р - содержание никотинамида в стандартном образце, мг/мг;

а - навеска препарата, г;

L - заявленное количество никотинамида в одной таблетке, мг;

100 - пересчет в проценты.

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

*Растворитель*: фосфорной кислоты раствор 3 %.

*Подвижная фаза А.* Калия дигидрофосфата раствор 0,05 М pH 2,8.

*Подвижная фаза В*. Метанол

*Подвижная фаза В⎯Подвижная фаза А* (4:96).

Испытуемый раствор. Точную навеску порошка измельченных таблеток, эквивалентную по содержанию 1,2 мг кальция пантотената, помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем растворителем до метки обрабатывают ультразвуком 2 раза по 10 мин (несколько раз перемешивают при обработке ультразвуком). Аликвоту суспензии центрифугируют при не менее 3500 об/мин в течение около 10 мин и фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. Прозрачный фильтрат является испытуемым раствором. (Концентрация кальция пантотената около 0,024 мг/мл).

Испытуемый раствор хранят при температуре 15-25 °С в течение 5 ч.

Раствор стандартного образца кальция пантотената (0,024 мг/мл). Около 6,0 мг (точная навеска) стандартного образца кальция пантотената помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в растворителе, доводят объем раствора растворителем до метки и перемешивают.

В мерную колбу вместимостью 10 мл, помещают 1,0 мл раствора стандартного образца кальция пантотената, доводят объем раствора растворителем до метки и перемешивают. Раствор стандартного образца стабилен в течение 7 ч при температуре 15-25 °С.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка: | 250 х 4,0 мм, силикагель октадецилсилильный для хроматографии, 10 мкм; |
| Температура колонки: | 25 °С; |
| Температура образца | 25 °С; |
| Детектор: | УФ, 205 нм; |
| Объем пробы: | 20 мкл; |
| Скорость потока: | 1,8 мл/мин. |

Время хроматографирования: около 15 мин

Время удерживания пика пантотеновой кислоты около 9 мин.

*Проверка пригодности хроматографической системы*

На хроматограмме раствора стандартного образца кальция пантотената

̶ *относительное стандартное отклонение* площадей пика пантотеновой кислоты не более 2,0 %;

*̶ фактор асимметрии (Аs) пика* пантотеновой кислоты не более 1,5;

*̶ эффективность хроматографической колонки* (N), рассчитанная по пику пантотеновой кислоты, не менее 1000 теоретических тарелок.

Затем вводят испытуемый раствор, регистрируют хроматограммы.

Содержание пантотеновой кислоты C9H17NO5 в препарате в процентах (Х) вычисляют по формуле:

Х=

где: S1 - площадь пика пантотеновой кислоты на хроматограмме испытуемого

раствора;

So - площадь пика пантотеновой кислоты на хроматограммах стандартного

раствора;

ао - навеска стандартного образца кальция пантотената, мг;

Р - содержание кальция пантотената в стандартном образце, в пересчете на

сухое вещество, мг/мг;

G - средняя масса таблеток, мг;

а - навеска испытуемого образца, мг;

L - заявленное количество кальция пантотената в таблетке, мг.

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

*Растворитель*: В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 6,23 г динатрия гидрофосфата дигидрата и 5,46 г натрия дигидрофосфата дигидрата растворяют в воде, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

*Подвижная фаза*. В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 5,1 г тетрабутиламмония дигидрофосфата, 6,23 г динатрия гидрофосфата дигидрата, 3,14 г натрия дигидрофосфата дигидрата, прибавляют 170 мл метанола, доводят объем раствора водой до метки и тщательно перемешивают.

Перед использованием подвижную фазу фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм и дегазируют любым подходящим способом

⃰Если это необходимо для анализа (при увеличении количества образцов), растворы реактивов могут быть приготовлены с соответствующей корректировкой навесок реактивов и объемов.

*Испытуемый раствор.* Точную навеску порошка измельченных таблеток, эквивалентную по содержанию 0,04 мг фолиевой кислоты помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют растворитель до около 75 % объема мерной колбы (после добавления растворителя сразу перемешивают во избежание прилипания порошка измельченных таблеток на стенки колбы), доводят объем раствора растворителем до метки и обрабатывают ультразвуком в течение около 20 мин (периодически встряхивая колбу). Аликвоту суспензии центрифугируют при не менее 3500 об/мин в течение около 10 мин и затем фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. Испытуемый раствор используют свежеприготовленным.

Раствор стандартного образца фолиевой кислоты. Около 10,0 мг (точная навеска) стандартного образца фолиевой кислоты помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в растворителе, доводят объем раствора растворителем до метки и перемешивают.

В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 1,0 мл раствора стандартного образца, доводят объем раствора растворителем до метки и перемешивают.

В мерную колбу вместимостью 25 мл, помещают 1,0 мл полученного раствора стандартного образца, от предыдущего разведения, доводят объем раствора растворителем до метки и перемешивают. (Концентрация фолиевой кислоты около 0,0016 мг/мл).

Раствор стандартного образца хранят при температуре 15-25 °С в течение 24 ч.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 330 х 4,0 мм силикагель октадецилсилильный для хроматографии, 3 мкм; |
| Температура колонки | 25 °С; |
| Температура образца: | 25 °С; |
| Детектор | спектрофотометрический: 280 нм; |
| Объем пробы | 20 мкл; |
| Скорость потока | 1,0 мл/мин; |

Время хроматографирования около 10 мин.

Время удерживания пика фолиевой кислоты: около 4 мин

*Проверка пригодности хроматографической системы*

На хроматограмме раствора стандартного образца фолиевой кислоты:

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

Затем вводят испытуемый раствор, регистрируют хроматограммы.

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

Х=

где: S1 - площадь пика фолиевой кислоты на хроматограмме испытуемого

раствора;

So - средняя площадь пика фолиевой кислоты на хроматограммах раствора

стандартногообразца;

ао - навеска стандартного образца фолиевой кислоты, мг;

Р - содержание фолиевой кислоты в стандартном образце, %;

G - средняя масса таблетки, в мг;

а - навеска образца, в миллиграммах;

L - заявленное количество фолиевой кислоты в таблетках, мг;

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

*Подвижная фаза А*. Вода

*Подвижная фаза В*. Метанол

*Подвижная фаза А⎯Подвижная фаза В 5:95.*

Испытуемый раствор. Точную навеску порошка измельченных и гомогенизированных таблеток, эквивалентную по содержанию 0,4 мг колекальциферола помещают в колбу Эрленмейера вместимостью 100 мл, прибавляют 10 мл диметилсульфоксида и 50 мл гексана. Перемешивают аккуратно и нагревают при постоянном легком взбалтывании при температуре 60 °С в течение около 45 мин. Охлаждают раствор до температуры 15-25 °С, взбалтывают на механическом шейкере в течение 15 мин и оставляют раствор на какое-то время Затем отбирают верхний слой гексана и пропускают через фильтр в колбу для ротационного испарителя вместимостью 250 мл. К остатку в колбе Эрленмейера (слой диметилсульфоксида) прибавляют 30 мл гексана и взбалтывают на механическом шейкере в течение около 15 мин, отбирают верхний слой гексана в колбу для ротационного испарителя. Экстрагирование повторяют еще 2 раза с 30 мл гексана. Содержимое колбы выпаривают на ротационном испарителе при температуре 40 °С досуха. Сухой остаток растворяют в 5,0 мл метанола и фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. (Концентрация колекальциферола около 80 МЕ/мл)

Раствор стандартного образца колекальциферола

Количество стандартного образца колекальциферола (точная навеска), содержащее 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 мл, помещают 1,0 мл раствора стандартного образца, доводят объем раствора метанолом до метки и перемешивают. В колбу Эрленмейера вместимостью 100 мл, помещают 1,0 мл полученного раствора от предыдущего разведения прибаляют 10 мл диметилсульфоксида и 50 мл гексана, аккуратно перемешивают и нагревают при постоянном легком взбалтывании при температуре 60 °С в течение около 45 мин. Охлаждают раствор до 15-25 °С, взбалтывают на механическом шейкере в течение 15 мин и оставляют раствор на какое-то время. Затем отбирают верхний слой гексана и пропускают через фильтр для разделения фаз в колбу для ротационного испарителя вместимостью 250 мл. К остатку в колбе Эрленмейера (слой диметилсульфоксида) прибавляют 30 мл гексана и взбалтывают на механическом шейкере в течение около 15 мин, отбирают верхний слой гексана в колбу для ротационного испарителя. Экстрагирование повторяют еще 2 раза по 30 мл гексана.

Содержимое колбы выпаривают на ротационном испарителе при температуре 40 °С досуха. Сухой остаток растворяют в 5,0 мл метанола и фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. (Концентрация колекальциферола около 80 МЕ/мл). Раствор стандартного образца хранят при температуре 15-25 °С в течение 47 ч.

*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: | 0,6 мл/мин. |

Время хроматографирования: около 42 мин.

Время удерживания пика колекальциферола: около 5 мин

*Проверка пригодности хроматографической системы*

На хроматограмме раствора стандартного образца колекальциферола:

* *относительное стандартное отклонение* площадей пика колекальциферола не более 2,0 % (5 введений);
* *фактор асимметрии (*As*) пика* колекальциферола не более 2,0;
* *эффективность хроматографической колонки (N)*, рассчитанная по пику колекальциферола, не менее 1000 теоретических тарелок.

Затем вводят испытуемый раствор, регистрируют хроматограммы.

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

Х=

где: S1 - 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;

G - средняя масса таблетки, г;

а - навеска образца, г;

L - заявленное количество колекальциферола, 80 МЕ.

**Фосфор.** Определение проводят методом УФ-спектрофотометрии (ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях»).

*Раствор восстановителя*: В мерную колбу вместимостью 250 мл помещают 29,3 г натрия метабисульфита, растворяют в около 200 мл воды. Прибавляют 0,25 г аминогидроксинафталинсульфоновой кислоты и необходимое количество натрия сульфита раствора 20 % для растворения реактивов (около 5 мл). Доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Испытуемый раствор. Точную навеску порошка измельченных таблеток, соответствующую около 10,0 мг фосфора, прибавляют 50 мл воды и 10 мл хлористоводородной кислоты раствора 1 М. Кипятят на плитке, охлаждают, доводят объем раствора водой до 100,0 мл и перемешивают. При необходимости фильтруют через фильтровальную бумагу «синяя лента» с размером пор 8 -15 мкм. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 10,0 мл прозрачного фильтрата доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Стандартный раствор. В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 0,5746 г динатрия гидрофосфата дигидрата, растворяют в воде, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 20,0 мл полученного раствора доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. (Концентрация фосфора -1:20 мкг/мл).

В каждую из мерных колб вместимостью 50 мл помещают 10,0 мл испытуемого раствора, 10,0 мл воды (раствор сравнения) и 2,0 мл, 3,0 мл, 5,0 мл, 7,0 мл стандартного раствора.

Реактивы прибавляют во все колбы в следующем порядке: 10 мл аммония молибдата раствора 2,5 %, 25 мл воды и 5 мл раствора восстановителя. После каждого прибавления растворы тщательно перемешивают. Доводят объем растворов водой до метки и перемешивают.

Через 30 мин измеряют оптическую плотность дериватизированных испытуемых растворов и стандартных растворов на спектрофотометре при длине волны 750 нм в кювете с толщиной слоя 1 см относительно раствора сравнения. Строят калибровочную кривую зависимости оптической плотности от концентрации.

Содержание фосфора (*Р*) в процентах от заявленного количества (X) вычисляют по формуле:

Х=,

где: С - концентрация фосфора по показаниям калибровочной кривой,

мг/мл;

G - средняя масса таблетки, мг;

а - навеска образца, мг;

L - заявленное количество фосфора в одной таблетке, мг.

***Кальций.*** Атомно-абсорбционная спектрометрия (ОФС Атомно-абсорбционная спектрометрия).

*Испытуемый раствор*. Точную навеску измельченных и гомогенизированных таблеток эквивалентную около 54,0 мг кальция гидрофосфата в двух повторностях помещают в мерные колбы вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл воды и 15,0 мл хлористоводородной кислоты раствора 1 М, перемешивают и нагревают до кипения. Выдерживают раствор до охлаждения, доводят объем раствора водой до метки, перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр с размером пор 8-15 мкм. Фильтрат испытуемого раствора при необходимости разводят. 1,0 мл испытуемого раствора и 1,0 мл калия хлорида раствора 10 % помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Испытуемый раствор хранят при температуре 15-25 °С в течение 24 ч.

*Контрольный испытуемый раствор* готовят тем же способом без исследуемого вещества.

Cтандартный раствор кальция (100 мг/л). 10,0 мл стандартного раствора кальция помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Растворы со стандартными добавками

В три мерные колбы вместимостью 100 мл помещают 1,0 мл основного испытуемого раствора и 1,0 мл калия хлорида раствора 10 %. В первую мерную колбу прибавляют 1,0 мл, во вторую колбу 2,0 мл, в третью колбу 3,0 мл стандартного раствора кальция (100 мг/л), доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Приготовленные таким образом растворы содержат соответственно 1,0 мг/л кальция, 2,0 мг/л кальция, 3,0 мг/л кальция.

Устанавливают прибор на ноль с помощью контрольного испытуемого раствора. Измеряют поглощение раствора со стандартными добавками и испытуемого раствора, получают калибровочную кривую. По калибровочной кривой определяют концентрацию кальция в образце. Результат представляет собой среднее значение по двум повторностям.

Содержание кальция (Ca) в процентах от заявленного количества (X) вычисляют по формуле:

Х=

где: С - концентрация кальция в испытуемом растворе, мг/л;

f - фактор разведения испытуемого раствора, мл/мл;

G - средняя масса таблетки, г;

а - навеска испытуемого образца, г;

L - заявленное количество кальция в таблетке, 12,5 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 пробирки вместимостью 50 мл помещают 500 мкл раствора внутреннего стандарта Bi, In, Li6, Sc, Tb, Y (100 мкг/мл), прибавляют 2,5 мл азотной кислоты концентрированной, доводят объем раствора водой для хроматографии до 50 мл и перемешивают.

Испытуемый раствор. Около 0,5 г (точная навеска) гомогенизированного образца препарата в двух повторностях помещают в реакционные сосуды или в виалы вместимостью 50 мл и прибавляют около 15 мл воды для храматографии, перемешивают и встряхивают приблизительно 1 мин. Доводят объем суспензии до 25 мл водой для хроматографии, перемешивают и фильтруют суспензию через фильтр с размером пор 0,20 мкм. В виалу вместимостью 50 мл помещают 10,0 мл фильтрата прибавляют 2,5 мл азотной кислоты концентрированной, доводят водой для хроматографии до 20 мл и перемешивают.

Стандартный раствор кобальта (1,0 мг/л). В хроматографический флакон вместимостью 50 мл помещают 50 мкл стандартного раствора кобальта (1000 мг/л) и 2,5 мл азотной кислоты концентрированной, доводят объем раствора водой для хроматографии до метки и перемешивают.

Стандартный раствор кобальта (10 мкг/л). В хроматографический флакон вместимостью 50 мл помещают 500 мкл основного стандартного раствора кобальта (1 мг/л) и 2,5 мл азотной кислоты концентрированной, доводят объем раствора водой для хроматографирования до метки и перемешивают.

Контрольный стандартный раствор. В хроматографический 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 (0,05 мкг/л). В хроматографический флакон вместимостью 50 мл помещают 250 мкл стандартного раствора кобальта (10 мкг/л) и 2,5 мл азотной кислоты концентрированной, доводят объем раствора водой для хроматографирования до метки и перемешивают.

Рабочий стандартный раствор кобальта (0,1 мкг/л). В хроматографический флакон вместимостью 50 мл помещают 500 мкл стандартного раствора кобальта (10 мкг/л) и 2,5 мл азотной кислоты концентрированной доводят объем раствора водой для хроматографирования до метки и перемешивают.

Рабочий стандартный раствор кобальта (0,5 мкг/л). В хроматографический флакон вместимостью 50 мл помещают 2500 мкл стандартного раствора кобальта (10 мкг/л) и 2,5 мл азотной кислоты концентрированной доводят объем раствора водой для хроматографирования до метки и перемешивают.

Контрольный стандартный раствор кобальта (0,1 мкг/л). В хроматографический флакон вместимостью 50 мл помещают 50 мкл стандартного раствор кобальта (1000 мг/л) и 2,5 мл азотной кислоты концентрированной доводят объем раствора водой для хроматографирования до метки и перемешивают. В хроматографический флакон вместимостью 50 мл помещают 500 мкл раствора и 2,5 мл азотной кислоты концентрированной, доводят объем раствора водой для хроматографирования до метки и перемешивают. В хроматографический флакон вместимостью 50 мл, помещают 500 мкл раствора и 2,5 мл азотной кислоты концентрированной доводят объем раствора водой для хроматографирования до метки и перемешивают.

*Контрольный раствор.* В хроматографический флакон вместимостью 50 мл прибавляют около 15 мл воды для хроматографии, перемешивают и встряхивают приблизительно 1 мин. Доводят объем раствора до 25 мл водой для хроматографии и перемешивают. Затем фильтруют раствор через фильтр с размером пор 0,20 мкм. В хроматографический флакон вместимостью 50 мл помещают 10,0 мл фильтрата, прибавляют 2,5 мл азотной кислоты концентрированной, доводят водой для хроматографии до 20 мл и перемешивают.

Испытуемый раствор хранят при температуре 15-25 °С в течение 24 ч.

*Рекомендуемые параметры (для масс-спектрометра):*

Мощность плазмы: 1600 Вт

Газ-носитель: 1,05 л/мин

Насос распылителя: 0,1 об/сек

Распылитель: стеклянный концентрический,

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 измеряют контрольный стандартный раствор кобальта (КСР1), контрольного раствора для испытуемого образца (КРИР), а затем испытуемого раствора (ИР-1) и соответствующего рабочего стандартного раствора (для определения пригодности, например, КСР 2) в конце.

Определяют концентрацию кобальта в образцах с использованием калибровочной кривой. Концентрацию цианокобаламина (витамина В12) рассчитывают по кобальту с использованием молекулярных масс. Результат представляет собой среднее значение по двум повторностям испытуемой порции.

|  |  |
| --- | --- |
| Параметр | **Требования** |
| Коэффициент корреляции (R) | R ≥ 0.99 |
| контрольный стандартный раствор кобальта (0,1 мкг/мл) | ±10 % от ожидаемого значения |
| Система пригодности (рабочий стандартный раствор; 0,1 мкг/мл) | ±10 % от ожидаемого значения |

Раствор внутреннего стандарта: Bi, In Li6, Sc, Tb, Y (1000 мкг/л) вводят в режиме реального времени через перистальтический насос, где раствор внутреннего стандарта смешивается с испытуемым раствором 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 (витамина В12) на среднюю массу таблетки в процентах (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 таблетки, г;

а - навеска испытуемого образца, г;

1355,37 - молекулярная масса цианокобаламина (витамин В12);

58,93 - атомная масса кобальта.

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

**Аскорбиновая кислота.** Метод Титриметрии.

*Дихлорфенолиндофенола раствор:* Точную навеску около 0,5 г дихлорфенолиндофенола натриевой соли помещают в лабораторный стакан, смачивают небольшим количеством холодной воды и перемешивают до образования высокодисперсной суспензии. Полученную суспензию переносят в мерную колбу вместимостью 1000 мл, прибавляют воды до 500 мл, колбу защищают от воздействия света, взбалтывают на шейкере в течение 30 мин, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Раствор быстро фильтруют через складчатый фильтр «белая лента» с размером пор от 7 до 20 мкм во флакон темного стекла. Флакон хранят в холодильнике. Срок годности раствора - 3 дня. Определение титра проводят непосредственно перед использованием.

*Установка титра.* 5,0 мл стандартного раствора помещают в высокий узкий лабораторный стакан, прибавляют 10 мл уксусной кислоты раствора 10 % (о/о) и 100 мл воды, тщательно перемешивают и быстро титруют раствором дихлорфенолиндофенола до розового окрашивания, не исчезающего в течение 30 с, - конечная точка титрования. При потенциометрическом, монотонном титровании в начале прибавляют соответствующую аликвоту раствора дихлорфенолиндофенола и продолжают титрование прибавляя 1,0 мл в минуту раствора дихлорфенолиндофенола постепенно по 0,1 мл. Используют комбинированный платиновый электрод. Одновременно титруют контрольный образец.

Расчет титра:

Емг/мл=,

где: ао – навеска аскорбиновой кислоты, которая содержится в 5 мл

стандартного раствора, мг;

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

V1 - объем раствора дихлорфенолиндофенола, пошедший на титрование стандартного раствора, мл;

V2 - объем раствора дихлорфенолиндофенола, пошедший на титрование контрольного образца, мл.

*Испытуемый раствор.* Точную навеску порошка измельченных таблеток соответствующую по содержанию около 5,0 мг аскорбиновой кислоты помещают в высокий лабораторный стакан, прибавляют 10 мл уксусной кислоты раствора 10 % и 100 мл воды, тщательно перемешивают.

Раствор стандартного образца аскорбиновой кислоты. Раствор готовят непосредственно перед использованием. Около 50,0 мг (точная навеска) стандартного образца аскорбиновой кислоты, помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в воде, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Испытуемый раствор быстро титруют дихлорфенолиндофенола раствором до розового окрашивания, не исчезающего в течение не менее 30 с, - конечная точка титрования. При потенциометрическом, монотонном титровании в начале прибавляют соответствующую аликвоту раствора дихлорфенолиндофенола и продолжают титрование прибавляя 1,0 мл в минуту раствора дихлорфенолиндофенола постепенно по 0,1 мл. Используют комбинированный платиновый электрод. Одновременно титруют контрольный образец.

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

Х=

где: V - объем раствора дихлорфенолиндофенола, пошедший на титрование

испытуемого образца, мл;

Е - титр раствора дихлорфенолиндофенола, мг/мл;

G - средняя масса таблеток, г;

а - навеска препарата, г;

L - заявленное количество аскорбиновой кислоты в препарате, мг;

100 - пересчет %.

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