**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |
| --- |
|  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Никотинамид+Пиридоксина гидрохлорид+Рибофлавин+Тиамина нитрат+альфа-Токоферола ацетат+Цианокобаламин+Сои культурной плодов сумма фосфолипидов, капсулы**  |  | **ФС** |
| **Nicotinamidum+Pyridoxini hydrochloridum+Riboflavinum+Thiamini nitras+ɑ-Tocopheroli acetas+Cyanocobalaminum+Glycini max semini phospholipidum, capsulae** |  | **Вводится впервые** |

|  |
| --- |
|  |

Настоящая фармакопейная статья распространяется на лекарственный препарат никотинамид+пиридоксина гидрохлорид+рибофлавин+тиамина нитрат+альфа-токоферола ацетат+цианокобаламин+cои культурной плодов сумма фосфолипидов, капсулы. Препарат должен соответствовать требованиям ОФС «Капсулы» и нижеприведённым требованиям.

Содержит:

- не менее 90,0 % и не более 133,0 % от заявленного количества никотинамида C6H6N2O;

- не менее 90,0 % и не более 150,0 % от заявленного количества пиридоксина гидрохлорида C8H11NO3·HCI;

- не менее 90,0 % и не более 142,0 % от заявленного количества рибофлавина C17H20N4O6;

- не менее 90 % и не более 150,0 % от заявленного количества тиамина нитрата C12H17N5;

- не менее 90 % и не более 130,0 % от заявленного количества альфа-токоферола ацетата С31Н52О3;

- не менее 90,0 % и не более 200,0 % от заявленного количества цианокобаламина C63H88CoN14O14P;

- не менее 85,0 % и не более 115,0 % от заявленного количества суммы фосфолипидов.

**Описание.** Содержание раздела должно соответствовать требованиям ОФС «Капсулы».

**Подлинность**

*1. ВЭЖХ.*Время удерживания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора должно соответствовать времени удерживания пика *α-токоферола ацетата* на хроматограмме раствора стандартного образца α-токоферола ацетата (раздел «Количественное определение»).

*2. ТСХ.* Определение *фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина* и *лизофосфатидилхолина* проводят методом ТСХ (ОФС «Тонкослойная хроматография).

*Пластинка.* ТСХ пластинка со слоем силикагеля F254 размером 15×15 см. Пластинку активируют в сушильном шкафу при температуре 105 ºС в течение 1 ч.

*Подвижная фаза (ПФ).* Вода—метанол—хлороформ 4:25:65.

*Испытуемый раствор.* Навеску содержимого капсул, эквивалентную около 300 мг фосфолипидов, помещают в колбу с притертой пробкой вместимостью 100 мл, прибавляют 30 мл смеси хлороформа с метанолом в соотношении 2:1, перемешивают на шейкере с частотой колебаний 250 мин-1 в течение 10 мин и фильтруют через небольшой фильтр с размером пор 8-15 мкм, отбрасывая первую порцию фильтрата.

*Раствор стандартного образца фосфатидилхолина*. В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают около 0,0675 г (точная навеска) стандартного образца L,α-фосфатидилхолина, растворяют в смеси метанола с хлороформом в соотношении 1:2, доводят объём раствора той же смесью до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

*Раствор стандартного образца фосфатидилэтаноламина*. В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают около 0,06 г (точная навеска) стандартного образца L,α - фосфатидилэтаноламина растворяют в смеси метанола с хлороформом в соотношении 1:2, доводят объём раствора той же смесью до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

*Раствор стандартного образца лизофосфатидилхолина*. В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают около 0,019 г (точная навеска) стандартного образца L,α - лизофосфатидилхолина растворяют в смеси метанола с хлороформом в соотношении 1:2, доводят объём раствора той же смесью до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

*Раствор для проверки разделительной способности хроматографической системы*. В коническую колбу вместимостью 25 мл помещают по 1 мл каждого раствора стандартного образца фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина и лизофосфатидилхолина и перемешивают.

 На линию старта пластинки наносят по 10 мкл испытуемого раствора, растворов стандартных образцов L,a - фосфатидилхолина, L,a - фосфатидилэтаноламина, L,a - лизофосфатидилхолина и раствора для проверки разделительной способности хроматографической системы в 5 точек. Пластинку с нанесёнными пробами сушат на воздухе в течение 5 мин, помещают в предварительно насыщенную в течение 30 мин камеру с ПФ и хроматографируют восходящим методом. Когда фронт ПФ пройдет около 90% длины пластинки от линии старта, её вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей, помещают в камеру, насыщенную парами йода, на 15 мин и просматривают в видимом свете.

*Пригодность хроматографической системы.* На хроматограмме раствора для проверки разделительной способности хроматографической системы должны обнаруживаться три четко разделенных зоны адсорбции с Rs:

- фосфатидилхолина – 1,00;

- фосфатидилэтаноламина ‑ не менее 1,2;

- лизофосфатидилхолина ‑ не менее 0,3.

Зона адсорбции фосфатидилхолина на хроматограмме испытуемого раствора по величине и интенсивности окрашивания должна быть не менее зоны адсорбции на хроматограмме раствора стандартного образца фосфатидилхолина. Зоны адсорбции фосфатидилэтаноламина и лизофосфатидилхолина на хроматограмме испытуемого раствора должны быть не более зон адсорбции на хроматограммах растворов стандартных образцов фосфатидилэтаноламина и лизофосфатидилхолина.

*3. Качественные реакции*

1) *Никотинамид.* В пробирку со шлифом вместимостью 5 мл помещают навеску содержимого капсул, эквивалентную около 45 мг никотинамида, прибавляют 1,0 мл натрия гидроксида раствора 2 М, закрывают пробкой и перемешивают в течение 3 мин при нагревании в водяной бане с температурой 80-90 °С. Через 15-20 мин должен наблюдаться запах аммиака и посинение смоченной водой красной лакмусовой бумаги.

2) *Пиридоксина гидрохлорид.* К 2 мл раствора 1 приготовленного для количественного определения пиридоксина гидрохлорида, прибавляют 1 мл раствора натрия ацетата, 1 мл аммиачного буферного раствора, 5 мл 2-пропанола и 1 мл 2,6-Дихлорхинонхлоримида раствор 0,04 % (в 2–пропаноле). Сразу же после перемешивания раствора должен наблюдаться зеленоватый оттенок раствора.

3) *Рибофлавин.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают навеску содержимого капсул, эквивалентную 2,1 мг рибофлавина, прибавляют 10 мл уксусной кислоты ледяной и нагревают на водяной бане в течение 10 мин, затем охлаждают, доводят объём раствора водой до метки, перемешивают и фильтруют через фильтр с размером пор 8-15 мкм. Должна наблюдаться жёлто-зелёная флюоресценция фильтрата при длине волны 365 нм или 254 нм.

4) *Тиамина нитрат.* К содержимому капсул, эквивалентному около 20 мг тиамина нитрата, прибавляют 10 мл воды, 1 мл уксусной кислоты раствора 2 М и 1,6 мл натрия гидроксида раствора 1 М, нагревают на водяной бане в течение 30 мин, охлаждают и фильтруют через слой ваты. К фильтрату прибавляют 5 мл натрия гидроксида раствора 1 М, 10 мл окислительной смеси (приготовление описано в разделе «Количественное определение. Тиамина нитрат»), 10 мл бутанола и перемешивают в течение 3 мин; должна наблюдаться синяя флюоресценция верхнего слоя при просмотре в УФ-свете длине волны 365 нм или 254 нм. Анализ повторяют, используя 0,9 мл натрия гидроксида раствора 1 М и 0,2 г натрия сульфита вместо 1,6 мл натрия гидроксида раствора 1 М; верхний слой практически не должен давать флюоресценцию.

*4. Микробиологический метод.* Величина зоны роста тест-культуры испытуемого раствора должна быть одного порядка с величиной зоны роста раствора стандартного образца цианокобаламина контрольной концентрации (раздел «Количественное определение. Цианокобаламин»).

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

**Распадаемость.** Не более 30 мин (с дисками). В соответствии с требованиями ОФС «Распадаемость таблеток и капсул».

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

**Количественное определение**

*1. альфа-Токоферола ацетат.* Определение проводят методом ВЭЖХ в соответствии с требованиями ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография».

*Подвижная фаза.* Вода—ацетонитрил—2-пропанол 1:45:54.

*Испытуемый раствор*. В мерную колбу со шлифом вместимостью 25 мл помещают точную навеску содержимого капсул, эквивалентную 6 мг токоферола ацетата, прибавляют 15 мл 2-пропанола и выдерживают на ультразвуковой бане в течение 20 мин. Объём раствора доводят тем же растворителем до метки, перемешивают и фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм, отбрасывая первые 5-10 мл фильтрата.

*Раствор стандартного образца α-токоферола ацетата 0,24 мг/мл*. В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают около 150 мг (точная навеска) стандартного образца α-токоферола ацетата, растворяют в 2-пропаноле, доводят объём раствора тем же растворителем до метки и перемешивают. 1,0 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объём раствора 2-пропанолом до метки и перемешивают.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка  | 150 × 3,9 мм, силикагель октилсилильный эндкепированный для хроматографии, 5 мкм; |
| Температура колонки | 25 °С; |
| Скорость потока | 1,0 мл/мин; |
| Детектор | спектрофотометрический, 284 нм; |
| Объём пробы | 20 мкл; |
| Время хроматографирования | 5 мин. |

Время удерживания α-токоферола ацетата – около 2,2 мин.

Хроматографируют раствор стандартного образца α-токоферола ацетата и испытуемый раствор.

*Пригодность хроматографической системы.* На хроматограмме раствора стандартного образца α-токоферола ацетата:

- *эффективность хроматографической колонки (N)*, рассчитанная по пику α-токоферола ацетата должна быть не менее 1200 теоретических тарелок;

- *фактор асимметрии (As)* пика α-токоферола ацетата должен быть не менее 0,8 и не более 2,0;

- *относительное стандартное отклонение* площади пика α-токоферола ацетата – не более 2,0 % (6 введений).

Содержание α-токоферола ацетата C31H52O3 в препарате в процентах от заявленного количества (*X*) вычисляют по формуле:

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

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *S*1 | – | площадь пика α-токоферола ацетата на хроматограмме испытуемого раствора; |
|  | *S*0 | − | площадь пика α-токоферола ацетата на хроматограмме раствора стандартного образца; |
|  | *а*1 | − | навеска содержимого капсул, г; |
|  | *а*0 | − | навеска стандартного образца α-токоферола ацетата, мг; |
|  | *G* | − | средняя масса содержимого капсулы, г; |
|  | *P* | − | содержание основного вещества в стандартном образце α-токоферола ацетата, %; |
|  | *L* | − | заявленное количество α-токоферола ацетата в капсуле, мг. |

*2. Никотинамид.* Определение проводят методом спектрофотометрии в соответствии с требованиями ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях».

Все растворы используют свежеприготовленными.

*0,05 М боратный буферный раствор рН 8,6±0,1.* В мерную колбу вместимостью 1000 мл вносят 6,7 г борной кислоты, 13,4 г натрия тетрабората, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

*Хлорамина раствор 1 %.* 1 г хлорамина растворяют в воде и доводят объём раствора водой до 100 мл.

*Испытуемый раствор.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают точную навеску содержимого капсул, эквивалентную около 30 мг никотинамида, прибавляют 50 мл воды и нагревают на водяной бане в течение 20 мин при периодическом перемешивании, охлаждают, доводят объём раствора водой до метки и перемешивают. Полученный раствор фильтруют через слой ваты, отбрасывая первые порции фильтрата. 5,0 мл фильтрата помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объём раствора водой до метки и перемешивают. Полученный раствор фильтруют через фильтр с размером пор 8-15 мкм, отбрасывая первые порции фильтрата.

В пробирку со шлифом вместимостью 25 мл помещают 1,0 мл испытуемого раствора, 1 мл воды, 1 мл хлористоводородной кислоты раствора 0,1 М, 8 мл свежеприготовленного хлорамина раствора 1 %, 1 мл аммония тиоцианата раствора 1 %, перемешивают и оставляют на 10 мин. К полученному раствору прибавляют 8 мл спирта 96 %, 2 мл калия дигидрофосфата раствора 0,1 М, 3 мл 0,05 М боратного буферного раствора рН 8,6±0,1 и нагревают в водяной бане при 60 °С в течение 10 мин, затем быстро охлаждают до температуры 15 – 25 ºС.

*Раствор стандартного образца никотинамида 0,06 мг/мл*. В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают около 30 мг (точная навеска) стандартного образца никотинамида, растворяют в воде, доводят объём раствора водой до метки и перемешивают. 5,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объём раствора водой до метки и перемешивают. Далее поступают, как описано в методике приготовления испытуемого раствора, начиная со слов «в пробирку со шлифом».

Оптическую плотность испытуемого раствора и раствора стандартного образца никотинамида измеряют на спектрофотометре в максимуме поглощенияпри длине волны 555 нм в кювете с толщиной слоя 1 см, используя в качестве раствора сравнения смесь спирта 96 % с водой в соотношении 1:2.

Содержание никотинамида C6H6N2O в препарате в процентах от заявленного количества (*Х*) вычисляют по формуле:

$$X=\frac{A\_{1}\_{ }∙a\_{0} ∙ 1 ∙100 ∙ 25 ∙ 5 ∙ P ∙ G }{A\_{0}∙a\_{1}∙1 ∙5∙ 50∙ 50 ∙L}=\frac{A\_{1}\_{ }∙a\_{0} ∙ P ∙ G }{A\_{0}∙a\_{1}∙ L},$$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *A1* | – | оптическая плотность испытуемого раствора; |
|  | *А0* | − | оптическая плотность раствора стандартного образца никотинамида; |
|  | *а*1 | − | навеска содержимого капсул, г; |
|  | *а*0 | − | навеска стандартного образца никотинамида, мг; |
|  | *G* | − | средняя масса содержимого капсулы, г; |
|  | *P* | − | содержание основного вещества в навеске стандартного образца никотинамида, %; |
|  | *L* | − | заявленное количество никотинамида в капсуле, мг. |

*3. Пиридоксина гидрохлорид.* Определение проводят методом спектрофотометрии в соответствии с требованиями ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях».

Все растворы используют свежеприготовленными.

*Борной кислоты раствор 5 %.* 5,0 г борной кислоты растворяют в воде при нагревании, раствор охлаждают, доводят объем раствора водой до 100,0 мл и перемешивают.

*Буферный раствор* *pH 9,5-10,0.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 60 мл воды, растворяют 16,5 г аммония хлорида, прибавляют 14,5 мл аммиака водного и доводят объём раствора водой до метки (pH 9,5-10,0).

*Натрия ацетата раствор 20 %.* 20,0 г натрия ацетата тригидрата растворяют в воде, доводят объём раствора водой до 100,0 мл и перемешивают.

*2,6-Дихлорхинонхлоримида раствор 0,05 %.* 25 мг 2,6-дихлорхинонхлоримида растворяют в 50 мл 2-пропанола, перемешивают.

*Испытуемый раствор.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают точную навеску содержимого капсул, эквивалентную 6 мг пиридоксина гидрохлорида, прибавляют 20 мл хлористоводородной кислоты разведённой 8,3 %, нагревают на водяной бане в течение 20 мин при периодическом перемешивании, охлаждают, доводят объём раствора водой до метки и перемешивают. Раствор фильтруют через фильтр с диаметром пор 8-15 мкм, отбрасывая первую порцию фильтрата. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 5,0 мл полученного раствора, доводят объём раствора водой до метки и перемешивают.

*Раствор стандартного образца пиридоксина гидрохлорида.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают около 30 мг (точная навеска) стандартного образца пиридоксина гидрохлорида, растворяют в воде, доводят объём раствора водой до метки и перемешивают. 1,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объём раствора водой до метки и перемешивают.

В конические колбы со шлифом вместимостью 50 мл помещают растворы и реактивы в последовательности и количестве, указанных в таблице 1.

**Таблица 1.** Порядок внесения реактивов в пробирки с раствором 1 и раствором 2.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Реактив | Испытуемый раствор | Контрольный раствор для испытуемого раствора | Раствор стандартного образца пиридоксина гидрохлорида | Контрольный раствор для раствора стандартного образца пиридоксина гидрохлорида |
| Испытуемый раствор | 2,0 мл | 2,0 мл | – | – |
| Раствор стандартного образца пиридоксина гидрохлорида | – | – | 2,0 мл | 2,0 мл |
| Натрия ацетата раствор 20 % | 1 мл | 1 мл | 1 мл | 1 мл |
| Буферный раствор pH 9,5-10,0 | 1 мл | 1 мл | 1 мл | 1 мл |
| Борной кислоты раствор 5 % | – | 1 мл | – | 1 мл |
| Вода | 1 мл | – | 1 мл | – |
| 2-Пропанол | 5 мл | 5 мл | 5 мл | 5 мл |
| 2,6-дихлорхинонхлоримида раствор 0,05% | 1 мл | 1 мл | 1 мл | 1 мл |

Через 4 мин измеряют оптическую плотность испытуемого раствора и раствора стандартного образца пиридоксина гидрохлорида на спектрофотометре при длине волны 650 нм в кювете с толщиной слоя 1 см, используя в качестве раствора сравнения воду. Параллельно проводят контрольный опыт для испытуемого раствора и раствора стандартного образца в аналогичных условиях (методика их приготовления также приведена в табл.1).

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

$$X=\frac{(A\_{1 }- A\_{2})∙a\_{0} ∙100∙100 ∙1 ∙ P ∙ G }{(A\_{3}-A\_{4})∙a ∙ 5 ∙100 ∙100 ∙ L},$$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *A*1 | – | оптическая плотность испытуемого раствора; |
|  | *A*2 | − | оптическая плотность контрольного раствора для испытуемого раствора; |
|  | *А*3 | – | оптическая плотность стандартного образца пиридоксина гидрохлорида |
|  | *A*4 | – | оптическая плотность контрольного раствора для стандартного образца пиридоксина гидрохлорида; |
|  | *а*1 | − | навеска содержимого капсул, г; |
|  | *а*0 | − | навеска стандартного образца пиридоксина гидрохлорида, мг; |
|  | *G* | − | средняя масса содержимого капсулы, г; |
|  | *P* | − | содержание основного вещества в стандартном образце пиридоксина гидрохлорида, %; |
|  | *L* | − | заявленное количество пиридоксина гидрохлорида в капсуле, мг. |

*4. Сумма фосфолипидов.* Определение суммарного содержания фосфолипидов проводят путём определения содержания общего фосфора методом спектрофотометрии в соответствии с ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях».

Все растворы используют свежеприготовленными.

*Раствор аммония ванадата.* В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 500 мл воды, доводят до кипения и растворяют в ней при перемешивании 2,5 г аммония ванадата. После охлаждения добавляют 20 мл азотной кислоты концентрированной, доводят объём раствора водой до метки и перемешивают.

*Раствор аммония молибдата.* 50 г аммония молибдата растворяют в 800 мл воды при температуре около 50 °С в мерной колбе вместимостью 1000 мл, затем охлаждают, доводят объём раствора водой до метки и перемешивают.

*Смесь реагентов*. Последовательно смешивают в равных количествах растворы азотной кислоты разведённой 16 %, аммония ванадата и аммония молибдата. Раствор реагентов должен быть полностью прозрачным и слегка желтоватым.

*Смесь кислот для минерализации.* В коническую колбу вместимостью 25 мл помещают азотную кислоту концентрированную, хлорную кислоту и серную кислоту концентрированную в соотношении 3:3:1 и перемешивают.

*Испытуемый раствор.* В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают точную навеску содержимого капсул, эквивалентную около 600 мг фосфолипидов, прибавляют 40 мл хлороформа и выдерживают смесь на ультразвуковой бане в течение 30 мин, затем доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают. Для проведения минерализации используют три параллельных опыта. В круглодонную колбу вместимостью 25 мл помещают 1,0 мл полученного раствора, прибавляют 1 мл смеси кислот для минерализации и нагревают на песчаной бане при температуре около 240 °С в течение 1 ч до обесцвечивания раствора. Во время нагревания круглодонную колбу накрывают маленькой стеклянной воронкой. Необходимо избегать нагревания смеси до высушивания. После охлаждения до температуры 15 – 25 ºС полученный раствор переносят с помощью 45 мл воды в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят уровень pH раствора до 7 аммиака раствором концентрированным 25 % по универсальной индикаторной бумаге (около 1 мл). В случае необходимости, рН раствора корректируют азотной кислотой разведённой 16 %. Раствор должен оставаться бесцветным, в противном случае процесс минерализации прошёл не полностью. В этом случае полученная смесь считается непригодной, и процедура повторяется сначала. К полученному раствору после минерализации прибавляют 50 мл смеси реагентов и доводят объём раствора водой до метки. Раствор тщательно перемешивают и помещают в тёмное место на 30 мин.

*Раствор сравнения для испытуемого раствора.* Раствор готовят аналогично испытуемому раствору, но на этапе минерализации вместо испытуемого раствора отбирают 1 мл хлороформа.

*Стандартный раствор фосфора 0,4364 мг/мл*. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 191,75 мг (точная навеска) калия дигидрофосфата (соответствует около 43,64 мг фосфора), предварительно высушенного до постоянной массы при температуре 103±2 °С, растворяют в воде, доводят объём раствора водой до метки и перемешивают.

*Калибровочные растворы.* В четыре мерные колбы вместимостью 100 мл помещают 5; 10; 15 и 25 мл раствора калия дигидрофосфата, прибавляют в каждую из них по 10 мл кислоты азотной разведённой 16 %, в каждой колбе доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. В четыре мерные колбы вместимостью 100 мл переносят по 10 мл каждого из полученных растворов соответственно, затем в каждую колбу добавляют по 50 мл смеси реагентов и доводят объём раствора в каждой колбе водой до метки, тщательно перемешивают и помещают в тёмное место на 30 мин (содержание фосфора составляет соответственно 2,18; 4,36; 6,54 и 10,01 мкг/мл).

*Раствор сравнения для калибровочных растворов*. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 1 мл кислоты азотной разведённой 16 % и 50 мл смеси реагентов, затем доводят объём раствора водой до метки, тщательно перемешивают, помещают в тёмное место на 30 мин.

Оптическую плотность всех полученных растворов измеряют на спектрофотометре при длине волны 425 нм в кювете с толщиной слоя 1 см, против соответствующего раствора сравнения.

Расчётный фактор (*F*), представляющий собой общее количество фосфора в калибровочном растворе при его поглощающей способности, равной 1,0, вычисляют по формуле:

*F* = *∑Сi/∑Аi*;

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *Сi* | – | содержание фосфора калибровочном растворе, мкг; |
|  | *Аi* | − | оптическая плотность соответствующего калибровочного раствора. |

Расчётный фактор должен быть от 20,2 до 21,5, определение его повторяют при изменении условий анализа.

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

$$X=\frac{A ∙F ∙50 ∙100 ∙ G ∙ 100}{a ∙ 1 ∙1000 ∙0,03 ∙ L}=\frac{A ∙F ∙500 ∙ G }{a ∙0,03 ∙ L},$$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *A* | – | оптическая плотность испытуемого раствора; |
|  | *а* | − | навеска содержимого капсул, г; |
|  | *G* | − | средняя масса содержимого капсулы, г; |
|  | *L* | − | заявленное содержание фосфолипидов в капсуле, мг; |
|  | *0,03* | − | коэффициент пересчета железа на фосфолипиды сои (100 г фосфолипидов из бобов сои содержат 3 г фосфора). |

*5. Тиамина нитрат.* Определение проводят методом флуориметрии в соответствии с ОФС «Флуориметрия».

*Окислительная смесь.* 0,120 г калия феррицианида растворяют в 2 мл воды, затем добавляют до 40 мл калия гидроксида раствора 30 % и перемешивают. Срок годности раствора 14 сут.

*Раствор стандартного образца тиамина нитрата 0,6 мкг/мл*. В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают около 75 мг (точная навеска) стандартного образца тиамина нитрата, растворяют в 10 мл хлористоводородной кислоты раствора 0,1 М, доводят объём раствора водой до метки и перемешивают. 2,0 мл полученного раствора помешают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объём раствора водой до метки и перемешивают. 1,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объём раствора водой до метки и перемешивают.

*Испытуемый раствор 0,6 мкг/мл.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают точную навеску содержимого капсул, эквивалентную около 6 мг тиамина нитрата, прибавляют 20 мл хлористоводородной кислоты раствора 0,1 М и нагревают на водяной бане в течение 30 мин при периодическом перемешивании. Содержимое колбы охлаждают, доводят объём раствора водой до метки и перемешивают. Полученный раствор фильтруют через фильтр с размером пор 8-15 мкм, отбрасывая первую порцию фильтрата. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 1,0 мл полученного раствора, доводят объём раствора водой до метки и перемешивают.

В две конические колбы со шлифом вместимостью 100 мл помещают по 5 мл окислительной смеси и по 25 мл бутанола, прибавляют по 2,0 мл полученных растворов и перемешивают в течение 2 мин. Содержимое колб переносят в делительные воронки и после разделения слоёв органический (верхний) помещают в конические колбы со шлифами с 10 г натрия сульфата безводного, содержимое каждой колбы перемешивают и фильтруют через небольшой слой ваты в две колбы со шлифом вместимостью 25 мл, отбрасывая первые порции фильтрата.

Интенсивность флуоресценции полученных после экстракции растворов измеряют на флуориметре (длина волны возбуждения – 365 нм, длина волны регистрации – 435 нм), используя в качестве раствора сравнения бутанол.

Содержание тиамина нитрата C12H17N5O4S в препарате в процентах от заявленного количества (*Х*) вычисляют по формуле:

$$X=\frac{I\_{1}∙ a\_{0}∙2∙1∙100∙100∙G∙P}{I\_{0}∙a\_{1}∙100∙50∙50∙1∙L}=\frac{I\_{1}∙ a\_{0}∙G∙P}{I\_{0}∙a\_{1}∙12,5∙L},$$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *I1* | – | интенсивность флюоресценции испытуемого раствора; |
|  | *I0* | − | интенсивность флюоресценции раствора стандартного образца тиамина нитрата; |
|  | *а*1 | − | навеска содержимого капсул, г; |
|  | *а*0 | − | навеска стандартного образца тиамина нитрата, мг; |
|  | *G* | − | средняя масса содержимого капсулы, г; |
|  | *P* | − | содержание основного вещества в стандартном образце тиамина нитрата, %; |
|  | *L* | − | заявленное количество тиамина нитрата в капсуле, мг; |

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

*Уксусной кислоты раствор 6 %.* 20 мл уксусной кислоты разведённой 30 % разбавляют водой до 100 мл. Раствор используют свежеприготовленным.

*Раствор стандартного образца рибофлавина*. Около 60 мг (точная навеска) стандартного образца рибофлавина помещают в коническую колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 8,5 мл уксусной кислоты раствора 6 % и 50 мл воды, затем нагревают на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 1ч. Содержимое колбы охлаждают, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 250 мл, доводят объём раствора водой до метки и перемешивают. 1,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, до водят объём раствора водой до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

*Испытуемый раствор.* В коническую колбу со шлифом вместимостью 100 мл помещают точную навеску содержимого капсул, эквивалентную около 6 мг рибофлавина, прибавляют 8,5 мл уксусной кислоты раствора 6 % и 50 мл воды, затем нагревают на водяной бане с обратным холодильником в течение 1 ч при периодическом перемешивании. Содержимое колбы охлаждают, количественно пере­носят в мерную колбу вместимостью 250 мл, доводят объём раствора водой до метки и перемешивают. Затем полученный раствор центрифугируют при скорости 6000 об/мин в течение 10 мин и фильтруют через фильтр с размером пор 8-15 мкм, отбрасывая первую порцию фильтрата. 5,0 мл фильтрата помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объём раствора водой до метки и перемешивают.

Флюоресценцию испытуемого раствора и раствора стандартного образца рибофлавина измеряют на флуориметре (длина волны возбуждения – 440 нм, длина волны регистрации – 535 нм), используя в качестве раствора сравнения воду.

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

$$X=\frac{I\_{1}∙ a\_{0}∙50∙1∙250∙G∙P}{I\_{0}∙a\_{1}∙250∙100∙5∙L}=\frac{I\_{1}∙ a\_{0}∙G∙P}{I\_{0}∙a\_{1}∙10∙L},$$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *I1* | – | интенсивность флюоресценции испытуемого раствора; |
|  | *I0* | − | интенсивность флюоресценции раствора стандартного образца рибофлавина; |
|  | *а*1 | − | навеска содержимого капсул, г; |
|  | *а*0 | − | навеска стандартного образца рибофлавина, мг; |
|  | *G* | − | средняя масса содержимого капсулы, г; |
|  | *P* | − | содержание основного вещества в стандартном образце рибофлавина, %; |
|  | *L* | − | заявленное количество рибофлавина в капсуле, мг. |

*7. Цианокобаламин.* Определение проводят микробиологическим методом в соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания витаминов в многокомпонентных лекарственных препаратах микробиологическим методом» (определение количественного содержания витаминов чашечным методом).

*Испытуемый раствор.* В центрифужную пробирку вместимостью 50 мл помещают точную навеску содержимого капсул, эквивалентную около 20 мкг цианокобаламина, прибавляют 10 мл смеси спирта 96 % с водой (1:2) и перемешивают стеклянной палочкой в течение 5 мин до получения однородной взвеси, затем центрифугируют при 3000 об/мин в течение 10 мин. 1,0 мл надосадочной жидкости помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят объем раствора натрия цитрата раствором 1 % до метки.

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

$$X=\frac{C∙ 50∙10∙G∙100 }{a∙1∙L} ,$$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *С* | – | содержание цианокобаламина в 1 мл испытуемого раствора, найденное по стандартной кривой, мкг; |
|  | *а* | − | навеска содержимого капсул, г; |
|  | *G* | − | средняя масса содержимого капсулы, г; |
|  | *L* | − | заявленное количество цианокобаламина в капсуле, мкг. |

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