**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |
| --- |
|  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Аскорбиновая кислота + Колекальциферол + Никотинамид + Пиридоксина гидрохлорид + Ретинола ацетат + Рибофлавин + Тиамина нитрат + альфа-Токоферола ацетат + Фолиевая кислота + Цианокобаламин + Железо + Кальций + Цинк, таблетки** |  | **ФС** |
| **Acidum ascorbicum + Colecalciferolum + Nicotinamidum + Pyridoxini hydrochloridum + Retinoli acetas + Riboflavinum + Thiamini nitras + ɑ-Tocopheroli acetas + Acidum folicum + Cyanocobalaminum + Ferrum + Calcium + Zincum, tabulettae** |  | **Вводится впервые** |

|  |
| --- |
|  |

Настоящая фармакопейная статья распространяется на лекарственный препарат Аскорбиновая кислота + Колекальциферол + Никотинамид + Пиридоксина гидрохлорид + Ретинола ацетат + Рибофлавин + Тиамина нитрат + альфа - Токоферола ацетат + Фолиевая кислота + Цианокобаламин + Железо + Кальций + Цинк, таблетки. Препарат должен соответствовать ОФС «Таблетки» и нижеприведённым требованиям.

 Cодержит от заявленного количества:

* Аскорбиновую кислоту C6H8O6 – не менее 90,0 % и не более 150,0 %;
* Колекальциферол C27H44O – не менее 90,0 % и не более 165,0 %;
* Никотинамид C6H6N2O – не менее 90,0 % и не более 150,0 %;
* Пиридоксина гидрохлорид C8H11NO3·HCI – не менее 90,0 % и не более 150,0 %;
* Ретинола ацетат C22H32O2 –не менее 90,0 % и не более 165,0 %;
* Рибофлавин C17H20N4O6 – не менее 90,0 % и не более 150,0 %;
* Тиамина нитрат C12H17N5O4S – не менее 90,0 % и не более 150,0 %;
* альфа -Токоферола ацетат С31Н52О3 – не менее 90,0 % и не более 165,0 %;
* Фолиевую кислоту C19H19N7O6 – не менее 90,0 % и не более 150,0 %;
* Цианокобаламин C63H88CoN14O14P – не менее 90,0 % и не более 150,0 %;
* Железо в форме железа фумарата – не менее 90,0 % и не более 125,0 %;
* Кальций в форме кальция карбоната и кальция сульфата – не менее 90,0 % и не более 125,0 %;
* Цинк в форме цинка оксида – не менее 90,0 % и не более 125,0 %.

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

**Подлинность**

*ВЭЖХ.*Время удерживания основных пиков на хроматограммах испытуемых растворов должно соответствовать времени удерживания соответствующих пиков *колекальциферола, никотинамида, пиридоксина гидрохлорида, ретинола ацетата,* *рибофлавина, тиамина нитрата, фолиевой кислоты, цианокобаламина* на хроматограммах растворов стандартных образцов или стандартных растворов (раздел «Количественное определение»).

*Атомно-абсорбционная спектрометрия.* Величина абсорбции испытуемых растворов, описанных в соответствующих разделах испытания «Количественное определение» должна быть одного порядка для:

* *железа* при длине волны 248,3 нм и калибровочного раствора железа с концентрацией 5,0 мкг/мл;
* *кальция* при длине волны 422,7 нм и калибровочного раствора кальция с концентрацией 2,0 мкг/мл;
* *цинка* при длине волны 213,8 нм и калибровочного раствора цинка с концентрацией 2,0 мкг/мл.

*Качественная реакция*

 *Метиленового синего спиртовой раствор 0,05 %*. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 50 мг метиленового синего, растворяют в 50 мл спирта 95 %, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают.

 *Аскорбиновая кислота.* Навеску порошка растертых таблеток, эквивалентную около 0,2 г аскорбиновой кислоты, растворяют в 100 мл спирта 95 %, фильтруют через бумажный фильтр; к 2 мл фильтрата прибавляют 4 капли метиленового синего спиртового раствора 0,05 %, нагревают до температуры 40 °С. Должно наблюдаться темно-синее окрашивание раствора, которое значительно светлеет или исчезает через 3 мин.

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

 **Распадаемость.** Не более мин 60 мин, с дисками (ОФС «Распадаемость таблеток и капсул»).

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

**Количественное определение**

*Колекальциферол*

Определение проводят методом ВЭЖХ в соответствии с требованиями ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография».

 *Подвижная фаза*. 2-Пропанол—гексан 1:99.

 *Испытуемый раствор.* Точную навеску порошка растертых таблеток, эквивалентную около 50 мкг *колекальциферола* помещают в колбу с завинчивающейся крышкой, прибавляют 10 мл диметилсульфоксида и около 15 мл гексана, тщательно перемешивают в течение 45 мин на водяной бане при температуре 60 °С. Полученный раствор центрифугируют при 3000 об/мин в течение 10 мин. Гексановый слой переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл. К оставшемуся слою диметилсульфоксида прибавляют 15 мл гексана, перемешивают в течение 5 мин при температуре 15 - 25 ºС и переносят слой гексана в ту же мерную колбу. Эту операцию повторяют еще три раза, каждый раз прибавляя по 15 мл гексана. Объединенные гексановые извлечения собирают в ту же мерную колбу, доводят объем раствора гексаном до метки и перемешивают. Раствор фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм. 20,0 мл полученного раствора количественно переносят в подходящую колбу, упаривают в вакууме при температуре 18 – 20 °С до получения раствора объемом менее 5 мл. Полученный раствор количественно переносят в мерную колбу вместимостью 5 мл с помощью гексана, доводят объем раствора этим же растворителем до метки и перемешивают (содержание колекальциферола – около 2 мкг/мл).

  *Раствор стандартного образца колекальциферола 2 мкг/мл.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают около 20,0 мг (точная навеска) стандартного образца колекальциферола, доводят объем раствора гексаном до метки и перемешивают. В мерную колбу вместимостью 100 мл вносят 1,0 мл полученного раствора, доводят объем раствора гексаном до метки и перемешивают.

 *Раствор для проверки пригодности хроматографической системы*. Раствор стандартного образца колекальциферола нагревают при температуре 60 °С в течение 1 ч для частичной изомеризации колекальциферола.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка  | 150 × 4,6 мм, силикагель аминопропилсилильный для хроматографии, 3 мкм; |
| Температура колонки | 20 °С; |
| Скорость потока | 1,0 мл/мин; |
| Детектор | спектрофотометрический, 265 нм; |
| Объём пробы | 100 мкл. |
|  |  |

Хроматографируют раствор для проверки пригодности хроматографической системы, раствор стандартного образца колекальциферола и испытуемый раствор.

*Пригодность хроматографической системы.* На хроматограмме раствора для проверки пригодности хроматографической системы *разрешение (RS)* между пиками колекальциферола и его предшественника должно быть не менее не менее 10.

На хроматограмме раствора стандартного образца колекальциферола *относительное стандартное отклонение* площади пика колекальциферола должно быть не более 3,0 % (6 введений).

 Содержание колекальциферола C27H44O в препарате в процентах от заявленного содержания (*Х*) вычисляют по формуле:

$$X=\frac{S\_{1}∙a\_{0}·1·100·5∙G∙P·1,09·1000}{S\_{0}∙a\_{1}·100·100·20·L}=\frac{S\_{1}∙a\_{0}·5∙G∙P·1,09}{S\_{0}∙a\_{1}·2·L}, $$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *S*1 | − | площадь пика колекальциферола на хроматограмме испытуемого раствора; |
|  | *S*0 | − | площадь пика колекальциферола на хроматограмме раствора стандартного образца; |
|  | *a*0 | − | навеска стандартного образца колекальциферола, мг; |
|  | *a* | − | навеска порошка растертых таблеток, г; |
|  | *G* | − | средняя масса таблетки, г; |
|  | *P* | − | содержание основного вещества в стандартном образце колекальциферола, %; |
|  | *L* | – | заявленное содержание колекальциферола в таблетке, мкг; |
|  | *1,09* | − | коэффициент коррекции, используемый для учета среднего количества предшественника колекальциферола, присутствующего в пробе; |
|  | *1000* | − | пересчет мг в мкг. |

Содержание колекальциферола в препарате в ME (*Y*) вычисляют по формуле:

$$Y=\frac{X∙L}{100∙0,025}$$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *X* | − | содержание колекальциферола в препарате в процентах от заявленного количества, %; |
|  | *L* | − | заявленное количество колекальциферола в таблетке, мкг; |
|  | *0,025* | − | коэффициент пересчета. |

 *Ретинола ацетат*

Определение проводят методом ВЭЖХ в соответствии с требованиями ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография».

 *Подвижная фаза*. Гексан.

 *Испытуемый раствор.* Точную навеску порошка, эквивалентную около 6,88 мг *ретинола ацетата* помещают в колбу с завинчивающейся крышкой, прибавляют 10 мл диметилсульфоксида и около 15 мл гексана, тщательно перемешивают в течение 45 мин на водяной бане при температуре 60 °С. Полученный раствор центрифугируют при 3000 об/мин в течение 10 мин. Гексановый слой переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл. К оставшемуся слою диметилсульфоксида прибавляют 15 мл гексана, перемешивают в течение 5 мин при температуре 15 - 25 ºС и переносят слой гексана в ту же мерную колбу. Эту операцию повторяют еще три раза, каждый раз прибавляя по 15 мл гексана. Объединенные гексановые извлечения, собирают в ту же мерную колбу, доводят объем раствора гексаном до метки и перемешивают. В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 11,0 мл полученного раствора, доводят объем раствора гексаном до метки и перемешивают. Раствор фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм (содержание ретинола ацетата – около 15 мкг/ мл).

*Раствор стандартного образца ретинола ацетата 15 мкг/мл.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают около 15,0 мг (точная навеска) стандартного образца *ретинола ацетата*, растворяют в гексане, доводят объем раствора гексаном до метки и перемешивают. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 10,0 мл полученного раствора, доводят объем раствора гексаном до метки и перемешивают.

*Раствор для проверки пригодности хроматографической системы.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают около 15,0 мг (точная навеска) стандартного образца *ретинола пальмитата*, растворяют в гексане, доводят объем раствора гексаном до метки и перемешивают. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 10,0 мл полученного раствора, доводят объем раствора гексаном до метки и перемешивают. В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 25 мл полученного раствора, прибавляют 25 мл раствор стандартного образца *ретинола* *ацетата* и перемешивают. Полученный раствор имеет концентрацию 7,5 мкг/мл ретинола ацетата и 7,5 мкг/мл ретинола пальмитата.

 *Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка  | 150 × 4,6 мм, силикагель аминопропилсилильный для хроматографии, 3 мкм; |
| Температура колонки | 20 °С; |
| Скорость потока | 1,0 мл/мин; |
| Детектор | спектрофотометрический, 325 нм; |
| Объём пробы | 40 мкл; |
|  |  |

Хроматографируют раствор для проверки пригодности хроматографической системы, раствор стандартного образца ретинола ацетата и испытуемый раствор.

 *Пригодность хроматографической системы.* На хроматограмме раствора для проверки пригодности хроматографической системы:

* *разрешение (RS)* между пиками ретинола ацетата и ретинола пальмитата должно быть не менее не менее 10;
* *относительное стандартное отклонение* площади пиков ретинола ацетата должно быть не более 3,0 % (6 введений).

Содержание ретинола ацетата C22H32O2 в препарате в процентах от заявленного количества (*Х*) вычисляют по формуле:

$$X=\frac{S\_{1}∙a\_{0}·10·50·100∙G∙P}{S\_{0}∙a\_{1}·11·100·100·L}= \frac{S\_{1}∙a\_{0}·5·G∙P}{S\_{0}∙a\_{1}·11·L},$$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *S*1 | − | площадь пика ретинола ацетата на хроматограмме испытуемого раствора; |
|  | *S*0 | − | площадь пика ретинола ацетата на хроматограмме раствора стандартного образца; |
|  | *a*0 | − | навеска стандартного образца ретинола ацетата, мг; |
|  | *a* | − | навеска порошка растертых таблеток, г; |
|  | *G* | − | средняя масса таблетки, г; |
|  | *P* | − | содержание основного вещества в стандартном образце ретинола ацетата, %; |
|  | *L* | – | заявленное количество ретинола ацетата в таблетке, мг; |

Содержание ретинола ацетата C22H32O2 в препарате в ME (*Y*) вычисляют по формуле:

$$Y=\frac{X∙L }{100∙0,000344}= \frac{X∙L }{0,0344},$$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *X* | − | содержание ретинола ацетата в препарате в процентах от заявленного содержания, %; |
|  | *L* | − | заявленное количество ретинола ацетата в таблетке, мг; |
|  | *0,000344* | − | коэффициент пересчета МЕ ретинола ацетата в мг. |

*альфа - Токоферола ацетат*

Определение проводят методом ВЭЖХ в соответствии с требованиями ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография».

 *Фосфорная кислота разведенная 1,4 %.* В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 60 мл воды, 10 мл фосфорной кислоты концентрированной, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

*Подвижная фаза*. Фосфорная кислота разведенная 1,4 %—Метанол 5:95.

 *Испытуемый раствор.* Точную навеску порошка растертых таблеток, эквивалентную около 55 мг *альфа-токоферола ацетата*, помещают в колбу с завинчивающейся крышкой, прибавляют 10 мл диметилсульфоксида и около 15 мл гексана, тщательно перемешивают в течение 45 мин на водяной бане при температуре 60 °С. Полученный раствор центрифугируют при 3000 об/мин в течение 10 мин. Гексановый слой переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл. К оставшемуся слою диметилсульфоксида прибавляют 15 мл гексана, перемешивают в течение 5 мин при температуре 15 - 25 ºС и переносят слой гексана в ту же мерную колбу. Эту операцию повторяют еще три раза, каждый раз прибавляя по 15 мл гексана. Объединенные гексановые извлечения, собирают в ту же мерную колбу, доводят объем раствора гексаном до метки и перемешивают. Раствор фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм. 20,0 мл полученного раствора количественно переносят в подходящую колбу, упаривают в вакууме при температуре 18 – 20 °С досуха. Сухой остаток переносят с помощью метанола в мерную колбу вместимостью 5 мл, доводят объем раствора этим же растворителем до метки и перемешивают (концентрация токоферола ацетата – около 2,2 мг/мл).

 *Раствор стандартного образца альфа-токоферола ацетата 2 мг/мл.* В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают около 20 мг (точная навеска) стандартного образца альфа-токоферола ацетата, растворяют в метаноле, доводят объем раствора метанолом до метки и перемешивают.

  *Раствор для проверки пригодности хроматографической системы.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают около 65 мг (точная навеска) стандартного образца эргокальциферола, растворяют навеску в метаноле, доводят объем раствора метанолом до метки и перемешивают. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 100 мг (точная навеска) стандартного образца α-токоферола ацетата, 1,0 мл полученного раствора, прибавляют 30 мл метанола, при необходимости обрабатывают ультразвуком до растворения навески, охлаждают до температуры 15-25 ºС, доводят объем раствора метанолом до метки и перемешивают.

 *Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка  | 100 × 8,0 мм, силикагель октадецилсилильный для хроматографии, 5 мкм; |
| Температура колонки | 20 °С; |
| Скорость потока | 2,0 мл/мин; |
| Детектор | спектрофотометрический, 254 нм; |
| Объём пробы | 100 мкл. |
|  |  |

Относительное время удерживания α-токоферола ацетата – 1,0, эргокальциферола – около 0,5.

Хроматографируют раствор для проверки пригодности хроматографической системы, раствор стандартного образца альфа-токоферола ацетата и испытуемый раствор.

 *Пригодность хроматографической системы.* На хроматограмме раствора для проверки пригодности хроматографической системы:

* *разрешение (RS)* между пиками эргокальциферола и альфа-токоферола ацетата должно быть не менее не менее 12;
* *фактор асимметрии (As)* пика альфа-токоферола ацетата должен быть от 0,8 до 1,2;

На хроматотограмме раствора стандартного образца альфа-токоферола ацетата *относительное стандартное отклонение* площади пиков токоферола ацетата должно быть не более 3,0 % (6 введений).

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

$$X=\frac{S\_{1}∙a\_{0}·5·100∙G∙P}{S\_{0}∙a\_{1}·10·20·L}= \frac{S\_{1}∙a\_{0}·5∙G∙P}{S\_{0}∙a\_{1}·2·L},$$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *S*1 | − | площадь пика альфа-токоферола ацетата на хроматограмме испытуемого раствора; |
|  | *S*0 | − | площадь пика альфа-токоферола ацетата на хроматограмме раствора стандартного образца; |
|  | *a* | − | навеска порошка растертых таблеток, г; |
|  | *a*0 | − | навеска стандартного образца альфа-токоферола ацетата, мг; |
|  | *G* | − | средняя масса таблетки, г; |
|  | *P* | − | содержание основного вещества в стандартном образце альфа-токоферола ацетата, %; |
|  | *L* | – | заявленное количество альфа-токоферола ацетата в таблетке, мг. |

Содержание альфа-токоферола ацетата С31Н52О3 в препарате в ME (*Y*) вычисляют по формуле:

$$Y=\frac{X∙L }{100},$$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *X* | − | содержание альфа-токоферола ацетата в препарате в процентах от заявленного количества, %; |
|  | *L* | − | заявленное количество альфа-токоферола ацетата в таблетке, мг. |

*Никотинамид, Пиридоксина гидрохлорид, Рибофлавин, Тиамина нитрат*

Определение проводят методом ВЭЖХ в соответствии с требованиями ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография».

 *Подвижная фаза.* В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 1,400 г натрия гексансульфоната, растворяют в смеси уксусной кислоты ледяной, метанола и воды в соотношении 1:27:73, доводят объем раствора той же смесью до метки и перемешивают.

 *Растворитель*. Смесь уксусной кислоты ледяной, ацетонитрила и воды в соотношении 1: 5: 94.

 *Испытуемый раствор.* В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают точную навеску порошка растертых таблеток, эквивалентную около 27 мг никотинамида, 3,9 мг пиридоксина гидрохлорида, 2,55 мг рибофлавина, 2,25 мг тиамина нитрата, прибавляют 20 растворителя и перемешивают в течение 30 с. до полного суспендирования порошка. Пробирку помещают на водяную баню и нагревают при температуре 65-70 °С в течение 5 мин, перемешивают в течение 30 с, затем повторяют эту операцию еще раз, раствор охлаждают, доводят объем раствора до метки растворителем и перемешивают. Раствор фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм. Срок годности раствора – 3 ч.

 *Стандартный раствор.* В мерную колбу вместимостью 200 мл помещают около 216 мг (точная навеска) стандартного образца никотинамида, около 31 мг (точная навеска) стандартного образца пиридоксина гидрохлорида, около 20 мг (точная навеска) стандартного образца рибофлавина, около 18 мг (точная навеска) стандартного образца тиамина нитрата, прибавляют около 180 мл растворителя и перемешивают. Раствор нагревают на водяной бане при температуре 65-70  °С, регулярно помешивая до полного растворения (около 10 мин). Затем быстро (в течение не более 10 мин) охлаждают до температуры 15 - 25 ºС, доводят объем раствора растворителем до метки и перемешивают.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка  | 300 × 3,9 мм, силикагель октадецилсилильный для хроматографии, 5 мкм;  |
| Температура колонки | 20 °С; |
| Скорость потока | 1,0 мл/мин; |
| Детектор | спектрофотометрический, 280 нм; |
| Объём пробы | 10 мкл. |
|  |  |

Относительное время удерживания пика никотинамида – около 0,3, пиридоксина – около 0,5, рибофлавина – около 0,8, тиамина – около 1,0.

Хроматографируют стандартный и испытуемый раствор.

*Пригодность хроматографической системы.* На хроматограмме стандартногораствора:

* *разрешение* *(Rs)* между соседними пиками всех определяемых веществ должно быть не менее 1,0;
* *фактор асимметрии (As)* пика каждого компонента должен быть не более 3,0;
* *относительное стандартное отклонение* пика каждого компонента стандартного раствора должно быть не более 3,0 % (5 введений).

Содержание никотинамида C6H6N2O, пиридоксина гидрохлорида C8H11NO3·HCI, рибофлавина C17H20N4O6, тиамина нитрата C12H17N5O4S в препарате в процентах от заявленного количества (*X*) вычисляют по формуле:

*X* = $\frac{S\_{1} ∙ a\_{o }∙ 25 ∙ G ∙ P}{S\_{o}∙ a\_{1 }∙ 200 ∙ L}$ = $\frac{S\_{1} ∙ a\_{o }∙ 5 ∙ G ∙ P}{S\_{o}∙ a\_{1 }∙ 40 ∙ L}$,

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *S*1 | – | площадь пика никотинамида/пиридоксина гидрохлорида/ рибофлавина/ тиамина нитрата на хроматограмме испытуемого раствора; |
|  | *S*0 | − | площадь пика никотинамида/пиридоксина гидрохлорида/ рибофлавина/ тиамина нитрата на хроматограмме стандартного раствора; |
|  | *а*1 | − | навеска порошка растертых таблеток, г; |
|  | *а*0 | − | навеска стандартного образца никотинамида/пиридоксина гидрохлорида/ рибофлавина/ тиамина нитрата, мг; |
|  | *G* | − | средняя масса таблетки, г; |
|  | *P* | − | содержание основного вещества в стандартном образце, никотинамида/пиридоксина гидрохлорида/ рибофлавина/ тиамина нитрата, %; |
|  | *L* | − | заявленное количество никотинамида/пиридоксина гидрохлорида/ рибофлавина/ тиамина нитрата, мг. |

 *Фолиевая кислота*

Определение проводят методом ВЭЖХ в соответствии с требованиями ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография».

*Этилендиаминтетрауксусной кислоты раствор\*.* В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 3,72 г *этилендиаминтетрауксусной кислоты*, растворяют в натрия гидроксида растворе 1 М, доводят объема раствора тем же растворителем до метки и перемешивают.

*Диэтилентриаминпентауксусной кислоты раствор\*.* В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 5,0 г *Диэтилентриаминпентауксусной кислоты*, растворяют в натрия гидроксида растворе 1 М, доводят объема раствора тем же растворителем до метки и перемешивают.

**\*Примечание. Далее в анализе используют один из растворов.**

 *Фосфорной кислоты раствор 1,46 М.* 100,0 мл фосфорной кислоты концентрированной осторожно прибавляют к 0,8 л воды и доводят объём раствора водой до 1,0 л.

*Подвижная фаза*. В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 2 г калия дигидрофосфата, прибавляют 650 мл воды, перемешивают до растворения, прибавляют 12 мл тетрабутиламмония гидроксида раствора 1 М в метаноле, 7 мл фосфорной кислоты раствора 1,46 М и 240 мл метанола. Охлаждают до температуры 15 - 25 ºС, доводят pH до 7,0 фосфорной кислоты концентрированной или аммиака раствор 10 %, доводят объем раствора водой до метки и фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм. Перед использованием проверяют pH и, при необходимости, повторно корректируют.

 *Растворитель.* В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 2,0 г калия дигидрофосфата, растворяют в 300 мл воды, прибавляют 220 мл метанола, 300 мл воды, 19 мл тетрабутиламмония гидроксида раствора 1 М в метаноле, 7 мл фосфорной кислоты раствора 1,46 М и 30 мл этилендиаминтетрауксусной кислоты раствора или диэтилентриаминпентауксусной кислоты раствора, доводят pH раствора до 9,8 аммиака раствором 10 %. Доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

*Испытуемый раствор.* В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают точную навеску порошка растертых таблеток, эквивалентную около 0,4 мг фолиевой кислоты, прибавляют 20 мл растворителя, встряхивают в течение 10 мин, доводят объем раствора растворителем до метки и перемешивают. Раствор помещают в центрифужную пробирку из темного стекла вместимостью 50 мл и центрифугируют. Надосадочную жидкость фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм.

 *Раствор стандартного образца фолиевой кислоты 0,016 мг/мл.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают около 20,0 мг (точная навеска) стандартного образца фолиевой кислоты, растворяют в растворителе, доводят объем раствора растворителем до метки и перемешивают. В мерную колбу вместимостью 25 мл вносят 2,0 мл полученного раствора, доводят объем раствора растворителем до метки и перемешивают.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка  | 300 × 3,9 мм, силикагель октадецилсилильный для хроматографии, 5 мкм;  |
| Температура колонки | 20 °С; |
| Скорость потока | 1,0 мл/мин; |
| Детектор | спектрофотометрический, 280 нм; |
| Объём пробы | 15 мкл. |

Хроматографируют раствор стандартного образца фолиевой кислоты и испытуемый раствор.

*Пригодность хроматографической системы.* На хроматограмме раствора стандартного образца фолиевой кислоты:

* *фактор асимметрии (As)* пика фолиевой кислоты должен быть не более 3,0;
* *относительное стандартное отклонение* площади пика фолиевой кислоты должно быть не более 3,0 % (5 введений).

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

*X* = $\frac{S\_{1} ∙ a\_{o }∙ 2∙ 25 ∙ G ∙ P}{S\_{o}∙ a\_{1 }∙ 25∙ 100 ∙ L}$ = $\frac{S\_{1} ∙ a\_{o }∙ G ∙ P}{S\_{o}∙ a\_{1 }∙ 50 ∙ L}$,

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *S*1 | – | площадь пика фолиевой кислоты на хроматограмме испытуемого раствора; |
|  | *S*0 | − | площадь пика фолиевой кислоты на хроматограмме раствора стандартного образца; |
|  | *а*1 | − | навеска порошка растертых таблеток, г; |
|  | *а*0 | − | навеска стандартного образца фолиевой кислоты, мг; |
|  | *G* | − | средняя масса таблетки, г; |
|  | *P* | − | содержание основного вещества в стандартном образце фолиевой кислоты, %; |
|  | *L* | − | заявленное количество фолиевой кислоты, мг. |

*Цианокобаламин*

Определение проводят методом ВЭЖХ в соответствии с требованиями ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография».

 *Подвижная фаза (ПФ).* Метанол—вода 35:65.

 *Испытуемый раствор.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают точную навеску порошка растертых таблеток, эквивалентную около 100 мкг цианокобаламина, растворяют в воде, тщательно перемешивая в течение 2 мин, доводят объем раствора водой до метки, перемешивают. Раствор фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм, отбрасывая первые порции фильтрата.

 *Раствор стандартного образца цианокобаламина*. В мерную колбу вместимостью 500 мл, помещают около 10 мг (точная навеска) стандартного образца цианокобаламина, растворяют в воде, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. В мерную колбу вместимостью 100 мл переносят 5,0 мл полученного раствора, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка  | 150 × 4,6 мм, силикагель октадецилсилильный для хроматографии, 5 мкм;  |
| Температура колонки | 20 °С; |
| Скорость потока | 0,5 мл/мин; |
| Детектор | спектрофотометрический, 550 нм; |
| Объём пробы | 200 мкл. |

Хроматографируют раствор стандартного образца цианокобаламина и испытуемый раствор.

*Пригодность хроматографической системы.* На хроматограмме раствора стандартного образца цианокобаламина:

* *фактор асимметрии (As)* пика цианокобаламина должен быть не более 3,0;
* *относительное стандартное отклонение* площади пика цианокобаламина должно быть не более 3,0 % (5 введений).

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

*X* = $\frac{S\_{1} ∙ a\_{o }∙ 5∙ 100 ∙ G ∙ P∙ 1000}{S\_{o}∙ a\_{1 }∙ 100∙ 500 ∙ L}$ = $\frac{S\_{1} ∙ a\_{o }∙ 10 ∙ G ∙ P}{S\_{o}∙ a\_{1 }∙ L}$,

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *S*1 | – | площадь пика цианокобаламина на хроматограмме испытуемого раствора; |
|  | *S*0 | − | площадь пика цианокобаламина на хроматограмме раствора стандартного образца; |
|  | *а*1 | − | навеска порошка растертых таблеток, г; |
|  | *а*0 | − | навеска стандартного образца цианокобаламина, мг; |
|  | *G* | − | средняя масса таблетки, г; |
|  | *P* | − | содержание основного вещества в стандартном образце цианокобаламина, %; |
|  | *L* | − | заявленное количество цианокобаламина, мкг; |
|  | *1000* | − | перевод мг в мкг. |

 *Железо*

Определение проводят методом атомно-абсорбционной спектрометрии в соответствии с требованиями ОФС «Атомно-абсорбционная спектрометрия».

 *Испытуемый раствор*. Точную навеску порошка, эквивалентную по массе 300 мг железа, помещают в фарфоровый тигель, прокаливают в муфельной печи при температуре около 550 °С от 6 до 12 ч и охлаждают. К содержимому тигля с соблюдением мер предосторожности добавляют 60 мл хлористоводородной кислоты концентрированной и кипятят на плитке или паровой бане в течение 30 мин, периодически омывая внутреннюю поверхность тигля 6 М раствором хлористоводородной кислоты. Содержимое тигля охлаждают и количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл. Стенки тигля промывают небольшими порциями хлористоводородной кислоты раствора 6 М, добавляют в ту же колбу, доводят объем раствора водой до метки, перемешивают и фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм, отбрасывая первые 5 мл фильтрата.

*Испытуемый раствор для определения железа.* В мерную колбу вместимостью 250 мл вносят 10,0 мл испытуемого раствора, доводят объем раствора хлористоводородной кислоты раствором 0,12 М до метки и перемешивают. В мерную колбу вместимостью 100 мл вносят 4,0 мл полученного раствора, доводят объем раствора хлористоводородной кислоты раствором 0,12 М до метки и перемешивают (концентрация железа – около 5 мкг/мл).

 *Контрольный раствор.* Хлористоводородной кислоты раствор 0,12 М.

*Стандартный раствор железа 0,1 мг/мл.* В мерную колбу вместимостью 1000 мл, вносят около 100 мг (точная навеска) порошка железа, растворяют в 25 мл хлористоводородной кислоты раствора 6 М, встряхивают, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

 *Калибровочные растворы.* В 5 мерных колб вместимостью 100 мл вносят 2,0; 4,0; 5,0; 6,0; 8,0 мл *стандартного раствора железа 0,1 мг/мл*, доводят объем растворов водой до метки и перемешивают, концентрация железа в растворах соответственно 2,0; 4,0; 5,0; 6,0 и 8,0 мкг / мл.

*Условия испытания*

|  |  |
| --- | --- |
| Источник излучения | Спектральная лампа с полым катодом для определения железа; |
| Атомизация | ацетилен – воздух; |
| Длина волны | 248,3 нм. |

Измеряют поглощение контрольного, калибровочных растворов и испытуемого раствора для определения железа. Для каждого раствора проводят не менее 3 измерений. Строят калибровочную кривую зависимости средних результатов измерений, полученных для калибровочных растворов от их концентрации (мкг/мл). Содержание железа в испытуемом растворе определяют по калибровочному графику.

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

*X* = $\frac{С ∙ 100 ∙ 100 ∙ 250 ∙G ∙ 100 }{1000 ∙a ∙ 4 ∙ 10 ∙ L}$ = $\frac{С ∙ 6250 ∙G }{a ∙ L}$,

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *С* | – | концентрация железа в испытуемом растворе, определенная по калибровочному графику, мкг/мл; |
|  | *a* | − | навеска порошка растертых таблеток, г; |
|  | *G* | − | средняя масса таблетки, г; |
|  | *L* | − | заявленное количество железа в таблетке, мг.; |
|  | *1000* | − | перевод мг в мкг. |

 *Кальций*

Определение проводят методом атомно-абсорбционной спектрометрии в соответствии с требованиями ОФС «Атомно-абсорбционная спектрометрия».

 *Лантана(III) хлорида раствор 26,7% в хлористоводородной кислоты растворе 0,12 М.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 26,7 г лантана(III) хлорида гептагидрата, растворяют в хлористоводородной кислоты растворе 0,12 М, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают.

 *Испытуемый раствор*. Точную навеску порошка растертых таблеток, эквивалентную около 1000 мг кальция, помещают в фарфоровый тигель и далее испытания проводят, как описано в разделе «Количественное определение. Железо. Испытуемый раствор».

В мерную колбу вместимостью 250 мл вносят 5,0 мл полученного раствора, доводят объем раствора хлористоводородной кислоты раствором 0,12 М до метки и перемешивают. В мерную колбу вместимостью 200 мл переносят 2,0 мл полученного раствора, добавляют 2 мл лантана(III) хлорида раствора 26,7% в хлористоводородной кислоты растворе 0,12 М, доводят объем раствора 0,12 М раствором хлористоводородной кислоты до метки и перемешивают (концентрация кальция около 2 мкг/мл).

*Контрольный раствор.* Хлористоводородной кислоты раствор 0,12 М.

 *Стандартный раствор кальция 100 мкг/мл.* В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 25 мл хлористоводородной кислоты раствора 1 М, около 1,001 г (точная навеска) кальция карбоната, предварительно высушенного при температуре 300°С в течение 3 ч, охлажденного в эксикаторе в течение 2 ч, перемешивают. Раствор кипятят для удаления двуокиси углерода, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. В мерную колбу вместимостью 20 мл переносят 5,0 мл полученного раствора, доводят объем раствора хлористоводородной кислоты раствором 0,12 М до метки и перемешивают.

*Калибровочные растворы.* В 5 мерных колб вместимостью 100 мл вносят 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 мл стандартного раствора кальция 100 мкг/мл, прибавляют по 1 мл лантана(III) хлорида раствора 26,7 % в хлористоводородной кислоты растворе 0,12 М, доводят объем раствора хлористоводородной кислоты раствором 0,12 М до метки и перемешиваю (получают растворы с содержанием кальция 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 и 3,0 мкг /мл соответственно).

*Условия испытания*

|  |  |
| --- | --- |
| Источник излучения | Спектральная лампа с полым катодом для определения кальция; |
| Атомизация | ацетилен – закись азота; |
| Длина волны | 422,7нм. |

Измеряют поглощение контрольного, калибровочных и испытуемого растворов. Для каждого раствора проводят не менее 3 измерений. Строят калибровочную кривую зависимости средних результатов измерений, полученных для калибровочных растворов от их концентрации (мкг/мл). Содержание кальция в испытуемом растворе определяют по калибровочному графику.

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

*X* = $\frac{С ∙ 100 ∙ 200 ∙ 250 ∙G ∙ 100 }{1000 ∙a ∙ 2 ∙ 5 ∙ L}$ = $\frac{\begin{array}{c}С ∙ 50000 ∙G\\ \end{array}}{ a ∙ L}$,

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *С* | – | концентрация кальция в испытуемом растворе, определенная по калибровочному графику, мкг/мл; |
|  | *a* | − | навеска порошка растертых таблеток, г; |
|  | *G* | − | средняя масса таблетки, г; |
|  | *L* | − | заявленное количество кальция в таблетке, мг; |
|  | *1000* | − | перевод мг в мкг. |

*Цинк*

Определение проводят методом атомно-абсорбционной спектрометрии в соответствии с требованиями ОФС «Атомно-абсорбционная спектрометрия».

 *Испытуемый раствор*. Точную навеску порошка, эквивалентную около 125 мг цинка, переносят в фарфоровый тигель и далее испытание проводят как описано в разделе «Количественное определение. Железо. Испытуемый раствор».

В мерную колбу вместимостью 100 мл, помещают 4,0 мл полученного раствора, доводят объем раствора хлористоводородной кислоты раствором 0,12 М до метки и перемешивают. В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 2,0 мл полученного раствора, доводят объем раствора хлористоводородной кислоты раствором 0,12 М до метки и перемешивают (концентрация цинка – около 2 мкг/мл).

*Контрольный раствор.* Хлористоводородной кислоты раствор 0,12 М.

*Стандартный раствор цинка 50 мкг/мл.* В мерную колбу вместимостью 250 мл, помещают около 311 мг цинка оксида (точная навеска, содержащая около 250 мг цинка), прибавляют 80 мл хлористоводородной кислоты раствора 5 М и, в случае необходимости, нагревают до растворения навески. Затем раствор охлаждают и доводят объем раствора водой до метки. В мерную колбу вместимостью 200 мл помещают 10,0 мл полученного раствора, доводят объем раствора хлористоводородной кислоты раствором 0,12 М до метки и перемешивают.

 *Калибровочные растворы.* В мерные колбы вместимостью 100 мл вносят 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 мл стандартного раствора цинка 50 мкг/мл, доводят объем растворов хлористоводородной кислоты раствором 0,12 М до метки и перемешивают (получают растворы с содержанием цинка 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 и 2,5 мкг /мл соответственно).

*Условия испытания*

|  |  |
| --- | --- |
| Источник излучения | Спектральная лампа с полым катодом для определения цинка; |
| Атомизация | ацетилен – воздух; |
| Длина волны | 213,8 нм. |

Измеряют поглощение контрольного, калибровочных и испытуемого растворов. Для каждого раствора проводят не менее 3 измерений. Строят калибровочную кривую зависимости средних результатов измерений, полученных для калибровочных растворов от их концентрации (мкг/мл). Содержание цинка в испытуемом растворе определяют по калибровочному графику.

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

*X* = $\frac{С ∙ 50 ∙ 100 ∙ 100 ∙G ∙ 100 }{1000 ∙a ∙ 2 ∙ 4 ∙ L}$ = $\frac{С ∙ 6250 ∙G }{ a ∙ L}$,

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *С* | – | концентрация цинка в испытуемом растворе, определенная по калибровочному графику, мкг/мл; |
|  | *a* | − | навеска порошка растертых таблеток, г; |
|  | *G* | − | средняя масса таблетки, г; |
|  | *L* | − | заявленное количество цинка в таблетке, мг; |
|  | *1000* | − | перевод мг в мкг. |

*Аскорбиновая кислота*

Определение проводят методом титриметрии.

*Метафосфорной кислоты раствор.* 15,0 г метафосфорной кислоты растворяют в 40 мл ледяной уксусной кислоты и разводят водой до 500 мл. Срок годности раствора – 2 суток.

 *0,0005 М раствор дихлорфенолиндофенола натриевой соли .* В мерную колбу вместимостью 200 мл помещают 42,0 мг натрия гидрокарбоната, растворяют в 100 мл воды, прибавляют 50,0 мг дихлорфенолиндофенола натриевой соли, энергично встряхивают до растворения навески, при необходимости нагревают, затем охлаждают до температуры 15-25 ºС, доводят водой до метки, перемешивают и фильтруют во флакон из темного стекла. Раствор хранят не более 3 суток и стандартизируют непосредственно перед использованием.

*Установка титра.* В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают около 50,0 мг (точная навеска) стандартного образца аскорбиновой кислоты, растворяют в метафосфорной кислоты растворе, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают. 2,0 мл полученного раствора сразу же переносят в колбу вместимостью 50 мл, содержащую 5 мл метафосфорной кислоты раствора и быстро титруют 0,0005 М раствором дихлорфенолиндофенола натриевой соли до появления розового окрашивания, сохраняющегося не менее 5 сек. Параллельно проводят контрольный опыт, титруя раствор, состоящий из 7 мл метафосфорной кислоты раствора и 20 мл воды.

1 мл 0,0005 М раствора  дихлорфенолиндофенола натриевой соли соответствует 0,1 мг аскорбиновой кислоты.

 В мерную колбу вместимостью 200 мл помещают точную навеску порошка растертых таблеток, эквивалентную 100 мг аскорбиновой кислоты, прибавляют 75 мл метафосфорной кислоты раствора, встряхивают в течение 30 мин, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Часть раствора переносят в пробирку для центрифугирования и центрифугируют до получения прозрачной надосадочной жидкости.

 В коническую колбу вместимостью 50 мл помещают 4,0 мл надосадочной жидкости, прибавляют 5 мл метафосфорной кислоты раствора и титруют 0,0005 М раствором дихлорфенолиндофенола натриевой соли до появления розового окрашивания, сохраняющегося в течение 5 сек.

Параллельно проводят контрольный опыт, титруя раствор, состоящий из 5,5 мл метафосфорной кислоты раствора и 15 мл воды.

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

*Х =*$ \frac{(V\_{1}-V\_{0}) ∙K ∙0,1 ∙200 ∙G∙100}{a ∙ 4 ∙ L}$*=*$\frac{(V\_{1}-V\_{0}) ∙K∙0,1∙ 50 ∙G∙100}{a ∙ L}$*,*

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *V*1 | – | объем титранта, израсходованный на титрование испытуемого раствора, мл; |
|  | *V*0 | − | объем титранта, израсходованный на титрование контрольного опыта, мл; |
|  | *K* | − | поправочный коэффициент к титру 0,0005 М раствора  дихлорфенолиндофенола натриевой соли; |
|  | *а* | − | навеска порошка растертых таблеток, г; |
|  | *G* | − | средняя масса таблетки, г; |
|  | *L* | − | заявленное количество аскорбиновой кислоты в таблетке, мг. |

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