**Бенфотиамин+Пиридоксин+ ФС**

**Цианокоболамин таблетки,**

**покрытые оболочкой Вводится впервые**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на комплексный поливитаминный лекарственный препарат Бенфотиамин+Пиридоксин+ Цианокоболамин таблетки, покрытые оболочкой применяемые в качестве лекарственного средства. Действующими веществами препарата являются: Бенфотиамин, Пиридоксин, Цианокоболамин.

Бенфотиамин С19H23N4O6PS (S-бензоилтиамин-О-монофосфат)  -жирорастворимый аналог витамина В1 ([тиамина](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A2%D0%B8%D0%B0%D0%BC%D0%B8%D0%BD)).

Пиридоксина гидрохлорид C8H11NO3·HCI, - витамин B6 (пиридоксин, пиридоксаль, пиридоксамин).

Цианокоболамин C63H88CoN14O14P - витамин В₁₂.

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

В состав препарата входят вспомогательные вещества.

ИСПЫТАНИЯ

Описание. Содержание раздела должно соответствоватьтребованиям ОФС «Таблетки».

Подлинность

Бенфотиамин, пиридоксина гидрохлорид. Метод ВЭЖХ.

Времена удерживания основных пиков на хроматограмме испытуемого раствора, приготовленного для количественного определения, должны соответствовать временам удерживания пиков бенфотиамина и пиридоксина на хроматограмме стандартного раствора. Определение проводят в соответствии с ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография»

Цианокобаламин. Метод ВЭЖХ.

Время удерживания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора, приготовленного для количественного определения, должно соответствовать времени удерживания основного пика на хроматограмме раствора СО цианокобаламина. Подлинность устанавливают одновременно с количественным определением методом ВЭЖХ и проводят в соответствии с ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография»

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

Тальк, титана диоксид. Не более 5,0 % суммарно. Определение проводят в соответствии с ОФС «Таблетки», раздел «Определение вспомогательных веществ».

Растворение. Определение проводят методом ВЭЖХ, в соответствии с требованиями ОФС «Растворение для твердых дозированных лекарственных форм», с использованием прибора типа «Лопастная мешалка».

Условия испытания:

среда растворения – вода,

объем среды растворения - 500 мл,

скорость вращения мешалки - 100 об/мин,

время растворения - 45 мин.

Приготовление подвижной фазы, разбавителя пробы и хроматографические условия приведены в разделе «Количественное определение. Бенфотиамин, пиридоксина гидрохлорид».

Испытуемый раствор. Одну таблетку помещают в сосуд для растворения добавляют в качестве среды 500 мл воды и проводят растворение. Через 45 мин, из каждого сосуда пипеткой, отбирают около 20 мл пробы, фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм, отбрасывая первые 5 мл фильтрата и охлаждают. 10 мл фильтрата помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора разбавителем пробы до метки и перемешивают.

Основной раствор СО бенфотиамина. Около 0,05 г (точная навеска) СО бенфотиамина помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 15 мл разбавителя пробы и нагревают, при периодическом перемешивании, на водяной бане до растворения навески, охлаждают, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают (основной раствор). Раствор хранят в емкости темного стекла при температуре от 2 до 8 °С в течение 14 сут.

Раствор СО бенфотиамина. 1 мл основного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора разбавителем пробы до метки, перемешивают и фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм. Раствор используют свежеприготовленным.

Хроматографируют раствор СО бенфотиамина не менее 5 раз и проводят проверку пригодности хроматографической системы.

Хроматографическая система считается пригодной, если на хроматограммах раствора СО бенфотиамина выполняются следующие условия:

* относительное стандартное отклонение площади пика бенфотиамина, рассчитанное по 5 последовательным хроматограммам - не более 2,0 %;
* эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику бенфотиамина - не менее 2000 теоретических тарелок;
* фактор асимметрии пика (AS) бенфотиамина - не более 2,0.

При условии выполнения требований теста «Проверка пригодности хроматографической системы», испытуемый раствор хроматографируют не менее трех раз.

Количество бенфотиамина (X) , перешедшего в раствор, в процентах

вычисляют по формуле:

Х=$\frac{S\_{1}∙a\_{0 }∙P∙500∙50∙1000∙100}{S\_{0}∙10∙50∙25∙L∙100}=\frac{S\_{1}∙a\_{0 }∙P∙2000}{S\_{0}∙L},$

где: S1 -  среднее значение площади пика бенфотиамина на хроматограммах испытуемого раствора;

So - среднее значение площади пика бенфотиамина на хроматограммах раствора СО бенфотиамина;

 ао - навеска СО бенфотиамина, г;

 Р - содержание основного вещества в СО бенфотиамина, %;

 L - номинальное содержание бенфотиамина в одной таблетке, мг;

 1000 - пересчет граммов мг.

Через 45 мин в раствор должно перейти не менее 75 % бенфотиамина, от заявленного содержания.

Родственные примеси

***Фосфотиамин*** - не более 1,0 %. Определение проводят методом ВЭЖХ.

Приготовление подвижной фазы и хроматографические условия приведены в разделе «Количественное определение. Бенфотиамин, пиридоксина гидрохлорид».

Испытуемый раствор. Около 0,58 г (точная навеска) порошка, из 20 растертых таблеток, помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 15 мл воды и выдерживают на ультразвуковой бане в течение 15 мин, далее охлаждают до комнатной температуры, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Полученный раствор центрифугируют в течение 15 мин при 9000 об/мин. Надосадочную жидкость фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм.

Раствор СО фосфотиамина. Около 0,025 г (точная навеска) стандартного образца (СО) фосфотиамина помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в воде, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Раствор хранят в течение 8 ч.

Стандартный раствор *пиридоксина*. Около 0,125 г (точная навеска) СО пиридоксина гидрохлорида помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 10 мл воды, прибавляют 2,5 мл раствора СО фосфотиамина, доводят объем раствора водой до метки, перемешивают и фильтруют через фильтр с размером пор 0,45 мкм. Раствор хранят в течение 8 ч.

Раствор для проверки чувствительности хроматографической системы. 5 мл стандартного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 20 мл, доводят объем раствора водой до метки, перемешивают и фильтруют через фильтр с размером пор 0,45 мкм. Раствор хранят в течение 8 ч.

Колонку уравновешивают подвижной фазой до достижения стабильной базовой линии, хроматографируют стандартный раствор не менее 5 раз и проводят проверку пригодности хроматографической системы.

Проверка пригодности хроматографической системы.

Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

на хроматограммах стандартного раствора:

* относительное стандартное отклонение площади пика фосфотиамина, рассчитанное по пяти последовательным хроматограммам - не более 2,0 %;
* эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику фосфотиамина - не менее 2500 теоретических тарелок;
* фактор асимметрии (Аs) пика фосфотиамина - не более 1,5;
* разрешение между пиками фосфотиамина и пиридоксина - не менее 2,0

на хроматограмме раствора для проверки чувствительности:

* соотношение сигнал/шум для пика фосфотиамина - не менее 10.

Ориентировочные времена удерживания:

* фосфотиамин - около 5 мин,
* пиридоксин - около 7 мин.

При условии выполнения требований теста «Проверка пригодности хроматографической системы», испытуемый раствор хроматографируют не менее трех раз.

Содержание фосфотиамина (X) в процентах, от номинального содержания бенфотиамина, вычисляют по формуле:

Х=$\frac{S\_{1}∙a\_{0}∙\left(100-W\right)∙25∙P∙2,5∙100∙G}{S\_{0}∙a\_{1}∙50∙100∙25∙L∙100}=\frac{S\_{1}∙a\_{0}∙\left(100-W\right)∙P∙G}{S\_{0}∙a\_{1}∙L∙2000},$

где: S1 - среднее значение площади пика фосфотиамина на хроматограммах испытуемого раствора;

S0 - среднее значение площади пика фосфотиамина на хроматограммах стандартного раствора;

а0 - навеска СО фосфотиамина, г;

а1 - навеска порошка растертых таблеток, г;

Р - содержание основного вещества в СО фосфотиамина, %;

G - средняя масса таблетки, мг;

L - номинальное содержание бенфотиамина в одной таблетке, мг;

W - содержание воды в СО фосфотиамина, определенное из навески 50 мг, процентах.

Однородность дозирования. Содержание бенфотиамина в каждой испытуемой таблетке должно соответствовать требованиям ОФС «Однородность дозирования» способ 1. Определение проводят методом ВЭЖХ.

Приготовление растворов, хроматографические условия и проверка пригодности хроматографической системы приведены в разделе «Количественное определение. Бенфотиамин, пиридоксина гидрохлорид».

Испытуемый раствор. Одну таблетку препарата помещают в мерную колбу вместимостью 200 мл, при постоянном взбалтывании прибавляют 160 мл разбавителя пробы. Колбу с содержимым в течение 10 мин выдерживают на водяной бане при температуре (80 - 85) °С, периодически, каждые 2 мин встряхивая, затем еще в течение 5 мин выдерживают в ультразвуковой бане. Содержимое колбы быстро охлаждают под струей холодной воды до комнатной температуры, доводят объем полученной суспензии разбавителем пробы до метки, перемешивают, помещают содержимое в центрифужную пробирку и центрифугируют в течение 5 мин при 9000 об/мин. Верхний слой декантируют, отбирают 5 мл полученного раствора в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора растворителем пробы до метки, перемешивают и фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм.

Проверка пригодности хроматографической системы.

Хроматографируют стандартный раствор не менее 5 раз и проводят проверку пригодности хроматографической системы.

Хроматографическая система считается пригодной, если на хроматограммах стандартного раствора выполняются следующие условия:

* эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику бенфотиамина - не менее 2000 теоретических тарелок;
* относительное стандартное отклонение площади пика бенфотиамина, рассчитанное по 5 последовательным хроматограммам - не более 2,0 %;
* фактор асимметрии пика (Аs) бенфотиамина - не более 2,0;
* разрешение между пиками бенфотиамина и пиридоксина - не менее 4,0.

При условии выполнения требований теста «Проверка пригодности хроматографической системы», хроматографируют испытуемый раствор не менее трех раз.

Содержание бенфотиамина в одной таблетке (X) в процентах, от номинального содержания, вычисляют по формуле:

Х=$\frac{S\_{1}∙a\_{0}∙P∙200∙50∙5∙1000∙100}{S\_{0}∙100∙100∙5∙25∙L}=\frac{S\_{1}∙a\_{0}∙P∙4000}{S\_{0}∙L},$

где: S1 - среднее значение площади пика бенфотиамина на хроматограммах испытуемого раствора;

So - среднее значение площади пика бенфотиамина на хроматограммах стандартного раствора;

ао - навеска СО бенфотиамина, г;

L - номинальное содержание бенфотиамина в одной таблетке, мг;

Р - содержание основного вещества в СО бенфотиамина, %;

1000 - пересчет граммов в мг.

Микробиологическая чистота. Должен выдерживать требования по категории 3А. (табл. 1) согласно ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение

Содержание в одной таблетке от заявленного :

* бенфотиамин от 90,0 до 110,0 %
* пиридоксина гидрохлорид от 90,0 до 110,0 %
* цианокобаламин от 90 до 150,0 %

**Бенфотиамин, пиридоксина гидрохлорид**. Определение проводят методом ВЭЖХ.

При приготовлении растворов используют растворители квалификации «для жидкостной хроматографии».

Испытуемый раствор. Точную навеску порошка растертых таблеток, эквивалентную 50 мг бенфотиамина или пиридоксина гидрохлорида помещают в мерную колбу вместимостью 200 мл, при постоянном взбалтывании прибавляют 160 мл разбавителя пробы, далее в течение 10 мин, выдерживают на водяной бане при температуре (80 - 85) °С, периодически, каждые 2 мин встряхивая, затем еще в течение 5 мин выдерживают на ультразвуковой бане. Затем содержимое колбы быстро охлаждают под струей холодной воды до комнатной температуры, доводят объем полученной суспензии разбавителем пробы до метки, перемешивают, помещают содержимое в центрифужную пробирку и центрифугируют в течение 5 мин при 9000 об/мин.

Верхний слой декантируют, отбирают 5 мл полученного раствора в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора разбавителем пробы до метки, перемешивают и фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм.

Основной стандартный раствор. Около 0,025 г (точная навеска) стандартного образца (СО) пиридоксина гидрохлорида и около 0,025 г (точная навеска) стандартного образца (СО) бенфотиамина помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 80 мл разбавителя пробы и выдерживают на водяной бане, при периодическом перемешивании, при температуре (80 - 85) °С в течение 15 мин, затем выдерживают 15 мин на ультразвуковой бане, быстро охлаждают, доводят объем раствора разбавителем пробы до метки и перемешивают (основной раствор). Раствор хранят в емкости с притертой пробкой при температуре от 2 до 8 °С в течение 7 сут.

Стандартный раствор. 5 *м*л основного стандартного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора разбавителем пробы до метки и перемешивают. Раствор хранят в течение 8 ч.

Подвижная фаза. 0,505 г натрия гептансульфоната растворяют в 400 мл воды в мерной колбе вместимостью 500 мл, прибавляют 5 мл уксусной кислоты ледяной и 0,250 мл триэтиламина, доводят объём раствора водой до метки, перемешивают и фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм.

К 200 мл полученного раствора прибавляют 30 мл ацетонитрила, перемешивают, фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм и дегазируют любым подходящим способом. Допускается корректировка соотношения компонентов подвижной фазы для соблюдения критериев пригодности хроматографической системы. Раствор хранят в течение 15 сут.

Разбавитель пробы. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 50 мл воды, 5 мл ацетонитрила, 1 мл уксусной кислоты ледяной, доводят объём раствора водой до метки и перемешивают. Раствор хранят в течение 7 сут.

*Хроматографические условия:*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка: | 150 х 4,6 мм, сорбент: силикагель октадецилсилильный (С18) с диаметром частиц 5 мкм или аналогичная |
| Температура колонки:  | 25 ± 3 °С |
| Скорость потока: | 0,8 мл/мин |
| Детектор: | УФ, 280 нм для бенфотиамина и пиридоксина гидрохлорида |
|  | УФ, 247 нм для фосфотиамина |
| Объем пробы: | 20 мкл для бенфотиамина и пиридоксина гид­рохлорида |
|  | 10 мкл для фосфотиамина |
| времена удерживания: | - пиридоксин - около 5 мин |
|  | - бенфотиамин - около 8 мин |

Общее время хроматографирования должно быть не менее 10 мин.

Колонку уравновешивают подвижной фазой до достижения стабильной базовой линии, хроматографируют стандартный раствор не менее пяти раз и проводят проверку пригодности хроматографической системы.

Проверка пригодности хроматографической системы.

Хроматографическая система считается пригодной, если на хроматограммах стандартного раствора выполняются следующие условия:

* относительное стандартное отклонение площадей пиков бенфотиамина и пиридоксина, рассчитанное по 5 последовательным хроматограммам - не более 2,0 %;
* эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику пиридоксина - не менее 2000 теоретических тарелок;
* фактор асимметрии пиков (Аs) бенфотиамина и пиридоксина - не более  2,0;
* разрешение между пиками бенфотиамина и пиридоксина - не менее

4,0.

При условии выполнения требований теста «Проверка пригодности хроматографической системы», хроматографируют испытуемый раствор не менее трех раз.

Содержание бенфотиамина (X) (или пиридоксина гидрохлорида) в одной таблетке в процентах, вычисляют по формуле:

Х=$\frac{S\_{1}∙a\_{0}∙P∙200∙25∙5∙G·100}{S\_{0}∙a\_{1}∙100∙100∙5∙25}=\frac{S\_{1}∙a\_{0}∙P∙G·2}{S\_{0}∙a\_{1}},$

где: S1 - среднее значение площади пика соответствующего компонента

 на хроматограммах испытуемого раствора;

So - среднее значение площади пика соответствующего компонента

 на хроматограммах стандартного раствора;

ао - навеска СО соответствующего компонента, г;

a1 - навеска порошка растертых таблеток, г;

Р - содержание основного вещества в СО соответствующего

 компонента, %;

G - средняя масса таблетки, мг.

*Цианокобаламин.* Содержание цианокобаламина определяют методом ВЭЖХ.

Промечания

Все операции с препаратом и стандартным образцом следует проводить в условиях максимальной защиты от света.

При приготовлении растворов используют растворители квалификации «для жидкостной хроматографии».

Испытуемый раствор. С 6 таблеток осторожно снимают оболочку с помощью кусочка ваты, пропитанной спиртом 96 %, таблетки сушат между листами фильтровальной бумаги, растирают и количественно переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют при постоянном взбалтывании три раза по 5 мл натрия эдетата раствора 3,0 %, встряхивают до полного смачивания содержимого, затем выдерживают на ультразвуковой бане (мощностью не менее 100 Вт) в течение 15 мин при температуре (25 ± 5) °С в защищенном от света месте, доводят объем раствора натрия эдетата раствором 3,0 % до метки, перемешивают, переносят в центрифужную пробирку и центрифугируют в течение 15 мин при 8000 об/мин. Осторожно из середины надосадочной жидкости шприцем отбирают около 2 мл пробы, фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм и немедленно вводят пробу в хроматограф.

Основной раствор СО цианокобаламина. Около 0,05 г (точная навеска) СО цианокобаламина помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 80 мл воды, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают (основной раствор). Раствор СО цианокобаламина хранят в защищенном от света месте при температуре (2 - 8) °С в течение 48 ч.

Раствор 1 СО цианокобаламина. 2,5 мл основного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Раствор хранят при комнатной температуре в течение 8 ч.

Раствор 2 СО цианокобаламина. 1,0 мл раствора 1 СО цианокобаламина помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора натрия эдетата раствором 3,0 % до метки и перемешивают. Раствор хранят при комнатной температуре в течение 8 ч.

Натрия эдетата раствор 3,0 %. 3 г натрия эдетата помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 70 мл воды и растворяют при нагревании на водяной бане при температуре (50 - 60) °С, периодически перемешивая, затем охлаждают до комнатной температуры, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Раствор хранят при комнатной температуре в течение 1 мес.

Подвижная фаза. К 150 мл фосфатного буферного раствора pH 3,0 прибавляют 50 мл метанола перемешивают, фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм и дегазируют любым подходящим способом.

Допускается корректировка соотношения компонентов подвижной фазы для соблюдения критериев пригодности хроматографической системы. Раствор хранят в герметично укупоренной таре при комнатной температуре в течение 15 сут.

*Хроматографические условия:*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка: | 150 х 4,6 мм, сорбент: силикагель октадецилсилильный (С18) с диаметром частиц 5 мкм или аналогичная |
| Температура колонки:  | 25 ± 3 °С |
| Скорость потока: | 0,75 мл/мин |
| Детектор: | 550 нм |
| Объем пробы: | 100 мкл  |
| Время удерживания: |  |
| цианокобаламина | около 10 мин |

Общее время хроматографирования - около 10 мин.

Колонку уравновешивают подвижной фазой до достижения стабильной базовой линии, хроматографируют раствор 2 СО цианокобаламина не менее пяти раз и проводят проверку пригодности хроматографической системы.

Проверка пригодности хроматографической системы.

Хроматографическая система считается пригодной, если на хроматограммах раствора 2 СО цианокобаламина выполняются следующие условия:

* относительные стандартные отклонения площади и времени удерживания пика цианокобаламина, рассчитанные по 5 последовательным хроматограммам - не более 5,0 %;
* эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику цианокобаламина - не менее 1000 теоретических тарелок;
* фактор асимметрии пика цианокобаламина - не более 2,0;
* соотношение сигнал/шум (S/N), определяемое отношением высоты пика цианокобаламина к уровню шума хроматографической системы - не менее 15,0.

Для уменьшения шума и увеличения соотношения S/N рекомендуется использование спектрофотометрического детектора с дополнительной лампой для видимого диапазона.

При условии выполнения требований теста «Проверка пригодности хроматографической системы», хроматографируют испытуемый раствор не менее трех раз.

Содержание цианокобаламина (X) в одной таблетке в процентах, вычисляют по формуле:

Х=$\frac{S\_{1}∙a\_{0}∙P∙2,5∙1∙25∙10^{6}·100}{S\_{0}∙100∙100∙100∙25∙6}=\frac{S\_{1}∙a\_{0}∙P∙250}{S\_{0}∙6},$

где: S1  - среднее значение площади пика цианокобаламина на хроматограммах испытуемого раствора;

S0 - среднее значение площади пика цианокобаламина на хроматограммах раствора 2 СО цианокобаламина;

а0 - навеска СО цианокобаламина, г;

Р - содержание основного вещества в СО цианокобаламина, %;

6 - количество таблеток, взятых на анализ;

106 - пересчет граммов в мкг.

# Транспортирование и хранение. При температуре не выше 25 °С. В соответствии с ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств».