**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |  |
| --- | --- |
| Аскорбиновая кислота + Ретинола пальмитат + Рибофлавин **+ Тиамина гидрохлорид, драже** ***Acidim ascorbicum + Retinoli palmitatum+ Riboflavinum+ Thiamini hydrochloridum,* dragee** |  **ФС** **Взамен ФС 42-1676-95** |

Настоящая фармакопейная статья распространяется на лекарственный препарат Аскорбиновая кислота + Ретинола пальмитат + Рибофлавин **+** Тиамина гидрохлорид, драже.

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

Препарат содержит от заявленного количества: не менее 90 % и не более 110 % аскорбиновой кислоты C6H8O6; не менее 85 % и не более 115 % ретинола пальмитат С36Н60О2; не менее 90 % и не более 110 % рибофлавин C17H20N4O6; не менее 90 % и не более 110 % тиамина гидрохлорид C12H17N4OS·HCl.

В состав препарата входят вспомогательные вещества.

Описание. Содержание раздела должно соответствоватьтребованиям ОФС «Драже».

**Подлинность**

Определение проводят методом ВЭЖХ по разделу «Количественное определение» в соответствии с ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография».

Времена удерживания основных пиков на хроматограмме испытуемых растворовретинола пальмитата, тиамина гидрохлорида, рибофлавина, аскорбиновой кислоты должны соответствовать по времени удерживания соответствующим пикам на хроматограммах стандартных растворов.

Тиамина гидрохлорид. (Альтернативный метод) Флуориметрический метод.

Качественная реакция окисления калия феррицианидом.

*Испытуемый раствор*. Точную навеску порошка растертых драже, эквивалентную по содержанию 10 мг тиамина гидрохлорида, 10 мг рибофлавина и 350 мг аскорбиновой кислоты взбалтывают с 25 мл воды и фильтруют через бумажный фильтр «красная лента».

К 5 мл испытуемого раствора прибавляют 1 мл натрия гидроксида раствора 10 %, 1 мл калия феррицианида раствора 5 %, 5 мл бутанола или 2-метилпропанола, встряхивают и дают разделиться слоям. В верхнем спир­товом слое при просмотре в ультрафиолетовом свете должна наблюдаться синяя флуоресценция, исчезающая при подкислении хлористоводородной кислотой разведенной 10 % и вновь возникающая при подщелачивании 10 % раствором натрия гидроксида.

*Рибофлавин.* (Альтернативный метод) Флуориметрический метод. Характерная флуоресценция водного раствора.

5 мл того же испытуемого раствора просматривают в ультрафиолето­вом свете; должна наблюдаться интенсивная желтовато-зеленая флуоресцен­ция, исчезающая при подкислении хлористоводородной кислотой разведен­ной 10 % или при подщелачивании натрия гидроксида раствором 10 %. Флу­оресценция также исчезает при прибавлении 0,1 г натрия гидрокарбоната и 0,1 г натрия гидросульфита.

*Аскорбиновая кислота.* (Альтернативный метод).Качественная реакция с фосфорномолибденовой кислотой. К 5 мл того же испытуемого раствора прибавляют 5 мл фосфорномолибденовой кислоты раствора 4 %; должно образоваться синее окрашивание

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

Тальк. Не более 3,0 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Таблетки», раздел «Определение вспомогательных веществ».

**Распадаемость.** Не более 30 мин. Определение проводят в соответствии с ОФС «Распадаемость таблеток и капсул» применяя прибор типа «Корзинка», с использованием дисков или иным валидированным методом.

# Условия испытания:

Среда проведения испытания - вода.

Температура - (37+ 2)°С;

Электромеханическое устройство, сообщающее корзинке возвратно-поступательное движение в вертикальной плоскости при частоте 29 - 32 цикла в 1 мин на расстоянии не менее 5,3 см и не более 5,7 см;

Время распадаемости - не более 30 мин.

**Микробиологическая чистота.** Испытание проводят в соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

**Количественное определение**

*Ретинола пальмитат.* Определение проводят методом ВЭЖХ.

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

Испытуемый раствор. Точную навеску порошка растертых драже, эквивалентную по содержанию 2,76 мг ретинола пальмитата помещают в коническую колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 5 мл хлористоводородной кислоты раствора 0,1 М, 2 мл спирта 96 % и нагревают на водяной бане при температуре 60 - 65 °С при перемешивании в течение 3 мин. Колбу охлаждают под струей холодной воды, содержимое количественно переносят 10 мл спирта 96 % в разделительную воронку и извлекают 15 мл гексана в течение 3 мин. Экстракцию повторяют дважды 15 мл гексана. Гексановые экстракты объединяют и фильтруют через вату, на которую помещено около 3 г натрия сульфата безводного, в круглодонную колбу вместимостью 100 мл. Гексан отгоняют под вакуумом на роторном испарителе при температуре не выше 40 °С. Сухой остаток количественно, с помощью метанола, переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора метанолом до метки, перемешивают и фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм.

Раствор стандартного образца (СО) ретинола палъмитата. Около 0,075 г (точная навеска) ретинола пальмитата фармакопейного СО или аналогичного качества помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 30 мл 2-пропанола, доводят объем раствора 2-пропанолом до метки и перемешивают (основной раствор). Раствор хранят в склянке с притёртой пробкой при температуре минус (20 ± 5) °С в течение 7 сут.

2 мл основного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора метанолом до метки и перемешивают. Раствор годен в течение 8 ч.

Подвижная фаза: метанол.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка: | 125 х 4,0 мм или 125 x 3 мм, сорбент: силикагель октадецилсилильный (С18) с диаметром частиц 5 мкм.  |
| Температура колонки:  | 25 ± 3 °С  |
| Детектор: | УФ, 326 нм |
| Объем пробы: | 20 мкл |
| Скорость потока: | 1,0 мл/мин для колонки 125 x 4 мм или0,5 мл/мин для колонки 125 x 3 мм |

Колонку уравновешивают подвижной фазой до достижения стабильной базовой линии и последовательно хроматографируют раствор СО ретинола пальмитата и испытуемый раствор не менее трех раз каждый.

Ориентировочное время удерживания ретинола пальмитата - около 8 мин.

Общее время хроматографирования должно быть не менее 15 мин.

Результаты анализа считаются достоверными, если выполняются тре­бования теста «Проверка пригодности хроматографической системы».

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

* эффективность хроматографической колонки должна составлять не менее 1000 теоретических тарелок;
* относительное стандартное отклонение площадей пиков ретинола пальмитата, рассчитанное по 3 последовательным хроматограммам, не более 2,0 %;
* фактор асимметрии (As), рассчитанный для пика ретинола пальмитата, - не более 2,0.

Содержание ретинола пальмитата (X) в одном драже, в процентах, от заявленного количества вычисляют по формуле:

Х=$\frac{S ∙a\_{0}∙P∙FˑGˑ100}{S\_{0}∙a\_{1}∙L}=\frac{S ∙a\_{0}∙FˑP∙G∙100}{S\_{0}∙a\_{1}∙L}$,

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

S0 - площадь пика ретинола пальмитата на хроматограмме стандартного

раствора;

a0- навеска СО ретинола пальмитата для приготовления стандартного раствора, г;

a1 - навеска порошка растертых драже для приготовления испытуемого

раствора, г;

G- средняя масса драже, г;

P - содержание ретинола пальмитата ацетата в CO ретинола

пальмитата %;

F – фактор разведения;

L - заявленное количества ретинола пальмитата в одном драже, г;

*Тиамина гидрохлорид, рибофлавин, аскорбиновая кислота.*

Определение проводят одним из альтернативных методов.

Метод (ВЭЖХ).

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

Испытуемый раствор. Точную навеску порошка растертых драже, эквивалентную по содержанию 1,0 мг тиамина гидрохлорида, 1,0 мг рибофлавина и 35,0 мг аскорбиновой кислоты помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 40 мл растворителя пробы и нагревают на водяной бане в течение 15 мин при температуре 50 - 60 °С. Содержимое колбы быстро охлаждают, доводят объем полученной суспензии разбавителем пробы до метки, перемешивают и затем центрифугируют при 8000 об/мин в течение 10 мин. Верхний слой декантируют и фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм.

Стандартный раствор. Около 0,010 г (точная навеска) тиамина гидрохлорида фармакопейного стандартного образца, 0,010 г (точная навеска) рибофлавина фармакопейного СО и 0,35 г (точная навеска) аскорбиновой кислоты СО помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и растворяют в 50 мл разбавителя пробы при нагревании на водяной бане при температуре 50 - 60 °С, затем охлаждают, доводят объем раствора разбавителем пробы до метки и тщательно перемешивают. 5 мл полученного 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.

*Подвижная фаза:* Смешивают раствор 1 и раствор 2 в объемном соотношении 78 : 22 и дегазируют любым удобным способом. Допускается корректировка соотношения компонентов подвижной фазы для достижения критериев пригодности хроматографической системы.

Раствор 1. 0,4 г натрия гексансульфоната помещают в мерную колбу вместимостью 500 мл, растворяют в 400 мл воды, прибавляют 5 мл уксусной кислоты ледяной и 0,25 мл триэтиламина, доводят объем раствора водой до метки, перемешивают и фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм. Раствор хранят в склянке с притертой пробкой в течение 7 сут.

Раствор 2. Раствор 1 смешивают с ацетонитрилом в объемном соотношении 3 : 2. Раствор хранят в герметично укупоренной таре в течение 7 сут.

Разбавитель пробы. К 250 мл воды прибавляют 25 мл ацетонитрила, 5 мл уксусной кислоты ледяной, доводят объем раствора водой до 500 мл и перемешивают.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка: | 150 х 4,6 мм, сорбент: силикагель октадецилсилильный (С18) с диаметром частиц 5 мкм.  |
| Температура колонки:  | 25 ± 3 °С |
| Детектор: | УФ, 260 нм |
| Объем пробы: | 10 мкл |
| Скорость потока: | 1,0 мл/мин |

Колонку уравновешивают подвижной фазой до достижения стабильной базовой линии и хроматографируют раствор СО не менее трех раз.

Порядок выхода и ориентировочные времена удерживания компонен­тов:

* аскорбиновая кислота - около 2 мин;
* тиамин - около 9 мин;
* рибофлавин - около 12,5 мин.

Общее время хроматографирования должно быть не менее 20 мин.

Результаты анализа считаются достоверными, если выполняются тре­бования теста «Проверка пригодности хроматографической системы». Хроматографическая система считается пригодной, если на хроматограмме раствора СО выполняются следующие условия:

* эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику аскорбиновой кислоты, должна быть не менее 1000 теоретических тарелок
* разрешение между пиками рибофлавина и аскорбиновой кислоты - не менее 1,4;
* относительное стандартное отклонение площадей пиков всех компонентов, рассчитанное по 3 последовательным хроматограммам, - не более 2,0 %;
* фактор асимметрии, рассчитанный по пику тиамина, - не более 1,5.

Содержание аскорбиновой кислоты (рибофлавина, тиамина гидрохло­рида) (X) в одном драже, в процентах от заявленного количества, вычисляют по формуле:

Х=$\frac{S ∙a\_{0}∙P∙F∙Gˑ100}{S\_{0}∙a\_{1}∙L}=\frac{S ∙a\_{0}∙P∙FˑG∙100}{S\_{0}∙a\_{1}∙L}$,

где: S - среднее значение площади пика аскорбиновой кислоты (рибофлавина, тиамина) на хроматограмме испытуемого раствора;

S0 - среднее значение площади пика аскорбиновой кислоты (рибофла­вина, тиамина) на хроматограмме раствора СО;

а - навеска порошка растертых драже, г;

а 0 - навеска СО аскорбиновой кислоты (рибофлавина, тиамина гидро­хлорида), г;

Р - содержание основного вещества в СО аскорбиновой кислоты (ри­бофлавина, тиамина гидрохлорида), %

L – заявленные количества аскорбиновой кислоты (рибофлавина,

тиамина) в одном драже, г;

F - фактор разведения;

G - средняя масса драже, г.

*Тиамина гидрохлорид.* Определение проводят флуориметрическим методом.

Испытуемый раствор. Точную навеску порошка, из 20 тщательно растертых драже эквивалентную по содержанию 2,0 мг тиамина гидрохлорида, помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 30 мл хлористоводородной кислоты раствора 0,01 М, взбалтывают, доводят объем раствора тем же растворителем до метки, перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр «красная лента», отбрасывая первые 10 мл фильтрата.

5 мл фильтрата помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора тем же раствором хлористоводородной кислоты до метки, перемешивают.

1 мл полученного раствора помещают в разделительную воронку с притертой пробкой вместимостью 50 мл, во вторую делительную воронку помещают 1 мл раствора СО тиамина гидрохлорида.

В обе разделительные воронки прибавляют по 4 мл калия хлорида раствора подкисленного и по 3 мл окислительной смеси, воронки одновременно встряхивают и оставляют стоять в течение 1 минуты, затем в обе воронки прибавляют по 15 мл изобутилового спирта, одновременно энергично встряхивают обе воронки в течение 2 минут и дают разделиться слоям. Водный слой удаляют, спиртовый - фильтруют через бумажный фильтр «красная лента», на который помещают около 1 г натрия сульфата безводного.

Измеряют интенсивность флуоресценции полученных растворов на флуориметре при длине волны около 436 нм.

Калия хлорида раствор подкисленный. 125 г калия хлорида помещают в мерную колбу вместимостью 500 мл, растворяют в 400 мл воды, прибавляют 4,5 мл хлористоводородной кислоты концентрированной, доводят объем рас­твора водой до метки и перемешивают.

Натрия гидроксида раствор 15 %. 15 г натрия гидроксида помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в воде, доводят объем рас­твора водой до метки и перемешивают. Раствору дают отстояться и прозрач­ную жидкость сливают. Раствор хранят в стеклянном сосуде с резиновой пробкой в течение 1 мес.

Окислительная смесь. 0,01 г калия феррицианида помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 1 мл воды, доводят объем раствора натрия гидроксида раствором 15 % до метки и перемешивают. Раствор годен в течение 2 ч.

Раствор СО тиамина гидрохлорида. Около 0,1 г (точная навеска) СО тиамина гидрохлорида помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, прибавляют 600 мл воды и 0,5 мл хлористоводородной кислоты концентрированной, перемешивают до полного растворения навески, дово­дят объем раствора водой до метки и перемешивают (основной раствор).

Раствор хранят во флаконе оранжевого стекла с притертой пробкой при температуре 2 - 8 °С в течение 1 мес.

1 мл основного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Раствор хранят в течение 8 ч.

Содержание тиамина гидрохлорида (X) в одном драже, в процентах от заявленного количества вычисляют по формуле:

Х=$\frac{I ∙a\_{0}∙P∙G∙Fˑ100}{I\_{0}∙a\_{1}∙L}=\frac{I ∙a\_{0}∙P∙FˑGˑ100}{I\_{0}∙a\_{1}∙L}$,

где: I - интенсивность флуоресценции испытуемого раствора;

I0 - интенсивность флуоресценции флуориметра раствора СО тиамина

гидрохлорида;

a0- навеска СО тиамина гидрохлорида, г;

a1 - навеска порошка растертых драже, г;

G- средняя масса драже, г;

P - содержание основного вещества в СО тиамина гидрохлорида, %;

L - заявленное количества тиамина гидрохлорида в одном драже, г;

F – фактор разведения.

При использовании СО тиамина гидрохлорида, производят пересчет на влагу по следующей формуле:

P=$\frac{P\_{1} ∙(100-W)}{100}$

где: Р1 - содержание основного вещества в СО, указанное в

сертификате в пересчете на безводное вещество, %;

W - содержание воды в СО, в процентах, определенное методом

К. Фишера, непосредственно перед проведением анализа в

соответствии с ОФС «Определение воды».

Навеска СО тиамина гидрохлорида для определения влаги - 50 мг.

*Рибофлавин.* (Альтернативная методика)⃰ Определение проводят флуориметрическим методом.

Испытуемый раствор. Точную навеску порошка, из 20 тщательно растертых драже, эквивалентную по содержанию 2,0 мг рибофлавина, помещают в коническую колбу вместимостью 500 мл, прибавляют 400 мл горячей воды и взбалтывают при нагревании на водяной бане при температуре 80 - 90 °С в течение 30 мин, охлаждают, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 500 мл, доводят объем раствора водой до метки, перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр «красная лента», отбрасывая первые 10 мл фильтрата.

10 мл фильтрата помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, до­водят объем раствора водой до метки, перемешивают.

Раствор СО рибофлавина. Около 0,04 г (точная навеска) СО рибофла­вина помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, прибавляют 600 мл горячей воды и перемешивают при нагревании на водяной бане до полного растворения навески, охлаждают, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают (основной раствор). Раствор хранят в склянке оранжевого стекла с притертой пробкой при температуре 2 - 8 °С в течение 1 мес.

 1 мл основного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Раствор хранят в течение 8 ч.

В кюветы флуориметра помещают: в одну - 10 мл испытуемого раствора, в другую - 10 мл раствора СО рибофлавина и измеряют интенсивность флуоресценции при длине волны около 440 нм. Параллельно, в конические колбы вместимостью 50 мл помещают: в одну - 10 мл испытуемого раствора и в другую - 10 мл раствора СО рибофлавина, в каждую прибавляют по 0,1 г натрия гидрокарбоната и натрия гидросульфита, перемешивают и измеряют интенсивность флуоресценции растворов в кюветах флуориметра в тех же условиях.

Содержание рибофлавина (X) в одном драже, в миллиграммах, рассчи­тывают по формуле:

Х=$\frac{(I\_{1} -I\_{2 })∙a\_{0}∙P∙F∙G∙100}{(I\_{3- I\_{4}})∙a\_{1}∙L}=\frac{I ∙a\_{0}∙P∙GˑFˑ100}{I\_{0}∙a\_{1}∙L}$,

где: I1 - интенсивность флуоресценции испытуемого раствора;

I2 - интенсивность флуоресценции испытуемого раствора после

гаше­ния флуоресценции;

I3 - интенсивность флуоресценции раствора СО рибофлавина;

I4 - интенсивность флуоресценции раствора СО рибофлавина после

гашения флуоресценции;

а - навеска порошка растертых драже, г;

а0 - навеска СО рибофлавина, г;

Р - содержание основного вещества в СО рибофлавина, %;

G - средняя масса драже, г;

L - заявленное количества тиамина гидрохлорида в одном драже, г;

F – фактор разведения.

*Аскорбиновая кислота.* (Альтернативная методика)⃰ Определение проводят методом титриметрии.

Испытуемый раствор. Точную навеску порошка, тщательно растертых драже, эквивалентную по содержанию 105 мг аскорбиновой кислоты, помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 30 мл воды, взбалтывают, доводят объем раствора водой до метки, перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр «красная лен­та», отбрасывая первые 10 мл фильтрата.

Далее определение проводят в соответствии с ОФС «Методы количественного определения витаминов», раздел «Определение водорастворимых витаминов», подраздел «5. Титриметрическое определение витамина С»,

10,0 мл полученного раствора помещают в коническую колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 1 мл хлористоводородной кислоты 2 %, 0,5 мл калия йодида раствора 1 %, 2 мл крахмала раствора 0,5 %, воду до общего объема 20 мл и титруют раствором калия йодата 0,00167 М до появления стойкого светло-синего окрашивания.

Параллельно проводят контрольный опыт.

Калия йодата раствор 0,00167 М. 50 мл 0,0167 М раствора калия йодата помещают в мерную колбу вместимостью 500 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Раствор хранят в течение 8 ч.

Содержание аскорбиновой кислоты (X) в одном драже, в процентах от заявленного количества вычисляют по формуле:

Х=$\frac{(V-V\_{k})∙K∙100∙0,8824∙G∙100}{a∙10∙1000}=\frac{(V-V\_{1 })∙K∙0,8824∙G}{a}$,

где: V - объем 0,00167 М раствора калия йодата, израсходованного на

титрование испытуемого раствора, мл;

VK - объем 0,00167 М раствора калия йодата, израсходованного на

титрование контрольного раствора, мл;

К - поправочный коэффициент к 0,00167 М раствору калия йодата;

а - навеска порошка растертых драже, г;

G - средняя масса драже, г;

0,8824 - количество аскорбиновой кислоты, соответствующее 1 мл

00167 М раствора калия йодата, мг.

**Хранение.** В защищенном от света месте, при температуре не выше 25 °С. В соответствии с ОФС «Хранение лекарственных средств».