МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |  |
| --- | --- |
| **Никотинамид +Пиридоксина гидрохлорид+Тиамина хлорид+ Фолиевая кислота+Цианокобаламин, таблетки****Nicotinamidum + Pyridocxini hydrochloridum +Thiamini chloridum+ Acidum folicum+ Cyanocobalaminum, tabulettae** | **ФС** **Взамен ФС 42 – 2156-99**  |

Настоящая фармакопейная статья распространяется на лекарственный препарат Никотинамид + Пиридоксина гидрохлорид+Тиамина хлорид +Фолиевая кислота +Цианокобаламин таблетки. Препарат должен соответствовать требованиям ОФС «Таблетки» и нижеприведенным требованиям.

Содержит от заявленного количества:

̶ Никотинамида С6Н6N2O – не менее 85 % и не более 115 %

̶ Пиридоксина гидрохлорида C8H11NO3·HCI – не менее 85 % и не более 110 %

̶ Тиамина хлорид C12H17N4OS·HCl – не менее 85 % и не более 115 %

̶ Фолиевая кислота C₁₉H₁₉N₇O₆ - не менее 80 % и не более 120 %

̶ Цианокоболамин C63H88CoN14O14P - не менее 80 % и не более 120 %

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

**Подлинность**

*ВЭЖХ*. Время удерживания основных пиков на хроматограммах испытуемых растворов должно соответствовать времени удерживания соответствующих пиков н*икотинамида, пиридоксина гидрохлорида, тиамина хлорида, фолиевой кислоты,* цианокобаламина*,* на хроматограммах соответствующих растворов стандартных образцов или стандартных растворов (раздел «Количественное определение»).

*Качественная реакция. Цианокобаламин.*

2 г порошка растертых таблеток помещают в коническую колбу вместимостью 100 мл, приливают 20 мл воды и взбалтывают в течение 2 - 3 мин, фильтруют через бумажный фильтр «белая лента» с размером пор 7-20 мкм. К 10 мл фильтрата прибавляют 0,5 мл водорода пероксида и выпаривают на водяной бане до 3 мл. Прибавляют 0,5 г натрия ацетата, 0,5 мл серной кислоты разведенной и 5 мл нитрозо-Р-соли раствора 0,5 % - появляется оранжевое окрашивание, сохраняющееся после прибавления 0,5 мл хлористоводородной кислоты разведенной.

**Однородность массы**. В соответствии с 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» с использованием дисков.

**Растворение.** Через 45 мин в раствор должно перейти не менее 70 % фолиевой кислоты, от заявленного содержания.

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

*Условия испытания:*

среда растворения – фосфатный буферный раствор с pH 8,0 без деаэрирования,

объем среды растворения - 500 мл,

скорость вращения корзинки - 100 об/мин,

время растворения - 45 мин.

*Подвижная фаза А. Л*ития перхлората раствор 0,4 М (pH = 2,4).

*Подвижная фаза В. А*цетонитрил.

Испытуемый раствор. В корзинку помещают одну таблетку. Через 45 мин отбирают пробу раствора в количестве около 100 мл и сразу же фильтруют через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм или через бумажный фильтр «белая лента» с размером пор 7-20 мкм, отбрасывая первые 20 мл фильтрата.

Количество кислоты фолиевой, перешедшее в раствор, определяют методом ВЭЖХ.

 *Раствор стандартного образца фолиевой кислоты.* Около 0,016 г (точная навеска) фолиевой кислоты помещают в мерную колбу вместимостью 200 мл, прибавляют 1 мл аммиака раствора концентрированного, 10 мл воды, растворяют, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

В мерную колбу вместимостью 50 мл, помещают 5 мл полученного раствора, приливают 5 мл фосфорной кислоты раствора 0,1М, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

В мерную колбу вместимостью 50 мл, помещают 5 мл раствора, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Раствор должен быть свежеприготовленным.

Хроматографируют поочередно по 7 мкл испытуемого раствора и разведенного раствора стандартного образца фолиевой кислоты на жидкостном хроматографе

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка: | 75 х 2,0 мм, сорбент: октадецилсилильный (С18) с диаметром частиц 5 мкм.  |
| Температура колонки:  | 35 °С |
| Детектор: | спектрофотометрический детектором в диапазоне 190 – 360 нм |
| Длина волны детектирования | УФ, 280 нм |
| Объем пробы: | 7 мкл |
| Скорость потока: | 0,1 мл/мин |

Время хроматографирования - 25 мин;

Режим хроматографического разделения - градиентный:

|  |  |
| --- | --- |
| Время, мин | Подвижная фаза % В |
| 0,0 – 8,00 | 2,0 |
| 8,0 – 25,0 | 5→20 |

Относительные времена удерживания и длины волн детектирования (при указанных рабочих условиях и указанном оборудовании)

 *Проверка пригодности хроматографической системы.* Проводят с раствором стандартного образца фолиевой кислоты. Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

* *Эффективность хроматографической колонки (N)*, рассчитанная по пику фолиевой кислоты, должна быть не менее 2000 теоретических тарелок.
* *Относительное стандартное отклонение*, рассчитанное для площади пика фолиевой кислоты, составляет менее 1,5 % (n = 6);
* *Асимметрия пика (AS)* фолиевой кислоты не должна превышать 2,0

Количество фолиевой кислоты (X), перешедшее в раствор в процентах, вычисляют по формуле:

X=$\frac{S\_{x}∙a\_{ст}∙5∙5∙500∙100∙P}{S\_{ст}∙200∙50∙50∙L∙100}=\frac{S\_{x}∙a\_{ст}∙P}{S\_{ст}∙L∙40},$

где Sx - площадь пика фолиевой кислоты на хроматограмме испытуемого

 раствора;

Sст - площадь пика фолиевой кислоты на хроматограмме раствора стандартного образца;

аст - навеска фолиевой кислоты в растворе, г;

L - содержание фолиевой кислоты в одной таблетке, г;

5, 50, 200, 500 - разведения, мл;

Р - содержание основного вещества в стандартном образце фолиевой кислоты, %.

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

**Количественное определение**

***Никотинамид, пиридоксина гидрохлорид тиамина хлорид и фолиевая кислота.*** Определение проводят методом ВЭЖХ (ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография»).

*Испытуемый раствор.* Точную навеску порошка растертых таблеток, эквивалентную по содержанию 41 мг тиамина хлорида, 20,5 мг пиридоксина гидрохлорида, 82 мг никотинамида, 1, 65 мг фолиевой кислоты помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, приливают 0,5 мл аммиака раствора концентрированного, 10 мл воды, взбалтывают в течение 10 мин, доводят объем раствора водой до метки, перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр «синяя лента» с размером пор 2- 8 мкм, отбрасывая первые порции фильтрата. 5 мл фильтрата помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, приливают 5 мл фосфор ной кислоты раствора 0,1 М, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

 *Раствор стандартного образца никотинамида***.** Около 16 мг (точная навеска) никотинамида помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 10 мл воды и растворяют, прибавляют по 1 мл растворов А, Б, В и 5 мл 0,1 М раствора кислоты фосфорной, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

*Раствор стандартного образца пиридоксина гидрохлорида***.** Около 100 мг (точная навеска) пиридоксина гидрохлорида помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 10 мл воды и растворяют, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают.

Раствор используют свежеприготовленным.

 *Раствор стандартного образца фолиевой кислоты***.** Около 32 мг (точная навеска) кислоты фолиевой помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 1 мл аммиака раствора концентрированного, 10 мл воды и растворяют, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Раствор используют свежеприготовленным.

*Раствор стандартного образца тиамина хлорида*. Около 200 мг (точная навеска) тиамина хлорида помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 10 мл воды и растворяют, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают.

Раствор используют свежеприготовленным.

*Подвижная фаза* А. Лития перхлората раствор 0,4 М (pH = 2,4).

*Подвижная фаза* В. Ацетонитрил.

По 5 мкл испытуемого раствора и раствора стандартного образца поочередно хроматографируют на жидкостном хроматографе.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка: | 75 х 2,0 мм, сорбент: октадецилсилильный (С18) с диаметром частиц 5 мкм.  |
| Температура колонки:  | 35 °С |
| Детектор: | спектрофотометрический детектором в диапазоне 190 – 360 нм |
| Длина волны детектирования | УФ, 210 нмУФ, 250 нм |
| Объем пробы: | 5 мкл |
| Скорость потока: | 0,1 мл/мин |

Время хроматографирования - 25 мин;

Режим хроматографического разделения - градиентный:

|  |  |
| --- | --- |
| Время, мин | ПФ % В |
| 0,0- 8,0 | 2,0 |
| 8,0 – 25,0 | 5→20 |

Относительные времена удерживания и длины волн детектирования (при указанных рабочих условиях и указанном оборудовании)

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Пики | Относительные времена удерживания (относительно нико­тинамида) | Длины волн детектирования |
| Пиридоксина гидрохлорид | 2,3 | 210 нм |
| Тиамина хлорида | 2,6 | 210 нм |
| Фолиевой кислота | 5,7 | 250 нм |

*Проверка пригодности хроматографической системы.* Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

* *Эффективность хроматографической колонки (N)*, рассчитанная по пику никотинамида, должна быть не менее 1300 теоретических тарелок:
* *Асимметрия пика* *(AS)* никотинамида не должна превышать 2,0:
* *Разрешение между пиками* никотинамида и пиридоксина гидрохлорида -21; между пиками пиридоксина гидрохлорида и тиамина хлорида - 1,6; между пиками тиамина хлорида и кислоты фолиевой - 19.
* *Коэффициент разделения* (Rs) должен быть не менее 1,5:

Содержание пиридоксина гидрохлорида (тиамина хлорида) (Х1) в одной

таблетке в процентах от заявленного количества вычисляют по формуле:

Х1=$\frac{S\_{x}∙a\_{ст}∙50∙50∙m∙P∙100}{S\_{ст}∙a\_{пр}∙5∙25∙100∙100}=\frac{S\_{x}∙a\_{ст}∙m∙P}{S\_{ст}∙a\_{пр}∙5},$

Содержание никотинамида (Х2) в одной таблетке в процентах от заявленного количества вычисляют по формуле:

Х2=$\frac{S\_{x}∙a\_{ст}∙50∙50∙m∙P∙100}{S\_{ст}∙a\_{пр}∙5∙100∙100}=\frac{S\_{x}∙a\_{ст}∙m∙P∙5}{S\_{ст}∙a\_{пр}},$

Содержание фолиевой кислоты (Х3) в одной таблетке в процентах от заявленного количества вычисляют по формуле:ɑ

Х3=$\frac{S\_{x}∙a\_{ст}∙50∙50∙m∙P∙100}{S\_{ст}∙a\_{пр}∙5∙100∙100∙100}=\frac{S\_{x}∙a\_{ст}∙m∙P}{S\_{ст}∙a\_{пр}∙20},$

где: Sx - площадь пика определяемого вещества на хроматограмме

 испытуемого раствора;

Sст - площадь пика определяемого вещества на хроматограмме раствора стандартного образца;

ɑст - навеска стандартного образца определяемого вещества, г;

ɑпр - навеска препарата, г;

m - средняя масса одной таблетки, г;

5, 25, 50, 100 - разведения, мл;

Р - содержание основного вещества в стандартном образце определяемого вещества, %.

За результат анализа принимают среднее арифметическое двух параллельных определений, расхождение между которыми не должно превышать 3 %.

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

*Примечание*

Приготовление лития перхлората раствора 0,4 М. 42,76 г лития перхлората помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Доводят pH раствора до 2,4 фосфорной кислотой концентрированной.

Раствор используют свежеприготовленным.

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

Подвижная фаза. Растворяют 1,0 мл фосфорной кислоты концентрированной в 700 мл воды. Раствор фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор 0,20 - 0,45 мкм, к раствору прибавляют 300 мл метанола (для жидкостной хроматографии), перемешивают и дегазируют любым подходящим способом. Раствор хранят в плотно закрытом сосуде при температуре 15-25 °С в течение 3-х недель.

*Испытуемый раствор*. Точную навеску растертых в порошок таблеток, эквивалентную 0,04 мг цианокобаламина, помещают в мерную колбу вместимостью 20 мл, прибавляют около 20 мл воды и помещают в ультразвуковую баню на 10-15 мин при комнатной температуре. Доводят объем раствора водой до метки, перемешивают. Осадок отделяют центрифугированием, надосадочную жидкость фильтруют через фильтр с диаметром пор 0,20 - 0,45 мкм. В мерную колбу вместимостью 20 мл помещают 10 мл полученного раствора и доводят объем раствора водой до метки и перемешивают (концентрация 0,001 мг/мл). Раствор должен быть свежеприготовленным.

Приготовление раствора стандартного образца А цианокобаламина. Около 40 мг (точная навеска) стандартного образца цианокобаламина помещают в мерную колбу вместимостью 200 мл, растворяют в 100 - 150 мл воды и доводят объем раствора водой до метки. В мерную колбу вместимостью 100 мл, помещают 5 мл полученного раствора, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают (раствор А). Раствор А хранят при комнатной температуре в течение недели.

Раствор стандартного образца цианокобаламина 1 мкг/мл. В мерную колбу вместимостью 100 мл, помещают 10 мл раствора А прибавляют 70-80 мл ПФ, доводят объем раствора ПФ до метки, перемешивают и фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор 0,20 - 0,45 мкм. 1 мл полученного раствора содержит 1,0 мкг цианокобаламина. Раствор должен быть свежеприготовленным.

Хроматографические условия:

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка: | 150 х 4,6 сорбент: силикагель октадецилсилильный с диаметром частиц 5 мкм |
| Температура колонки:  | 25 °С |
| Детектор: | УФ с переменной длиной волны |
| Длина волны детектирования | 550 нм |
| Объем пробы: | 100 (или 200) мкл |
| Скорость подачи элюента: | 1,0 мл/мин  |
|  |  |

Колонку промывают ПФ до достижения стабильной базовой линии, вводят и анализируют раздельно испытуемый и стандартный растворы. Регистрируют хроматограммы.

Для оценки пригодности хроматографической системы используются стандартный раствор цианокобаламина.

Хроматографическая система считается пригодной, если на хроматограмме стандартного раствора:

— *число теоретических тарелок*, рассчитанное по пику цианокобаламина, составляет не менее 1500;

— *асимметрия пика* цианокобаламина не более 1,5;

— *относительное стандартное отклонение* площади пика не более 5,0 % (n = 6).

Содержание цианокобаламина (Х) в 1 таблетке в процентах от заявленного количества вычисляют по формуле:

$X=\frac{S\_{1}\*a\_{0}\*P\*5\*10\*20\*20\*G}{S\_{0}\*a\_{1}\*200\*100\*100\*10\*L}$=$\frac{S\_{1}\*a\_{0}\*P\*G}{S\_{0}\*a\_{1}\*100\*10\*L}$

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

**Хранение.** В соответствии с ОФС «Хранение лекарственных средств».