**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ** \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

**Пиридоксина гидрохлорид + ФС**

**Тиамина гидрохлорида +**

**Цианокобаламин, таблетки**

**Pyridoxine Hydrochloride +**

**Thiamine Hydrochloride +**

 **Cyanocobalamin, tabulas Вводится впервые**

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

 Настоящая фармакопейная статья распространяется на комбинированный поливитаминный лекарственный препарат Пиридоксин гидрохлорид +Тиомин гидрохлорид + Цианокобаламин, таблетки.

 Одна таблетка препарата содержит от заявленного количества не менее 95 % и не более 105 % тиамина гидрохлорида С12Н17CLN4ОS·HCl (В1), не менее 95% и не более 100 % пиридоксина гидрохлорида С8Н11NО3 ˑНCL(В6,) и не менее 90 % и не более 125 % цианокобаламин C63H88CoN14O14P (B12).

В состав препарата входят вспомогательные вещества.

 Препарат должен отвечать требованиям ОФС «Таблетки», ОФС «Лекарственные формы» и выдерживать испытания нижеприведенным требованиям.

 **Описание.** Должен соответствовать требованиям ОФС «Таблетки».

 **Подлинность.** Время удерживания основных пиков на хроматограмме испытуемого раствора должны соответствовать времени удерживания основных пиков на хроматограмме стандартного раствора тиамина сульфата, пиридоксина гидрохлорида и цианокобаламина. Определение проводят методом ВЭЖХ в соответствии с ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография» по разделу «Количественное определение».

 **Однородность дозирования.** Проводят количественное определение содержания пиридоксина гидрохлорида и тиамина гидрохлорида в соответствии с ОФС «Однородность дозирования», способ 1 в каждой из отобранных таблеток препарата методом ВЭЖХ по разделу «Количественное определение».

*Приготовление испытуемого раствора.* Каждую из отобранных для испытания таблеток препарата помещают в отдельную мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют около 90 мл 0,1 М раствора хлористоводородной кислоты и растворяют в течение 30 мин на ультразвуковой бане. Далее раствор охлаждают до температуры 15 – 25 ⁰С, доводят объем раствора до метки 0,1 М раствором хлористоводородной кислоты и перемешивают на магнитной мешалки в течение 10 мин (скорость перемешивания 500 об/мин). Затем раствор фильтруют с помощью шприцевого мембранного фильтра с размером пор 0,45 мкм, 1 мл фильтрата помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора 0,1 М раствором хлористоводородной кислоты до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

Далее проводят хроматографирование испытуемых образцов в соответствии с методикой, указанной в разделе «Количественное определение» попеременно пиридоксина гидрохлорида и тиамина гидрохлорида испытуемых растворов и растворов стандартных образцов, регистрируя хроматограммы при 2-х длинах волн: 292 и 245 нм.

 Содержание пиридоксина гидрохлорида в одной таблетке в процентах от номинального значения (Хп) вычисляют по формуле:

 Хп = $\frac{Аисп∙Мсо∙Рп∙1∙100∙50∙100}{Асо∙25∙50∙1∙Пн}$,

 где: Аисп – среднее значение площади пика пиридоксина на хроматограммах испытуемого раствора, полученных при длине волны детектирования 292 нм;

Мсо – навеска стандартного образца пиридоксина гидрохлорид, мг;

Рп – содержание пиридоксина гидрохлорида в СО пиридоксина гидрохлорида, мг/мг;

Асо - среднее значение площади пика пиридоксина на хроматограммах раствора стандартного образца, полученных при длине волны детектирования 292 нм;

Пн – номинальное значение содержания пиридоксина гидрохлорида в таблетке, мг.

Содержание тиамина гидрохлорида в одной таблетке в процентах от номинального значения (Хт) вычисляют по формуле:

 Хт = $\frac{Ат∙Мсо∙Рт∙(100-В)∙1∙100∙50∙100}{Асо∙100∙50∙50∙1∙Пт}$ ,

где: Ат - среднее значение площади пика тиамина гидрохлорида на хроматограммах испытуемого раствора, полученных при длине волны детектирования 245 нм;

 Асо - среднее значение площади пика тиамина гидрохлорида на хроматограммах раствора СО, полученных при длине волны детектирования 245 нм;

 Мсо - навеска СО тиамина гидрохлорида, мг;

 Рт - содержание тиамина (на безводное вещество) в СО тиамина гидрохлорида, мг/мг;

 В – содержание воды в СО тиамина гидрохлорида, в процентах;

 Пт- номинальное значение содержания тиаминагидрохлорида в таблетке, мг.

 Далее проводят вычисление показателей приемлемости в соответствии с ОФС «Однородность дозирования». Таблица 2 - Порядок обработки экспериментальных данных.

 Результаты испытаний признаются удовлетворительными при соответствии критериев приемлемости для пиридоксина гидрохлорида и тиамина гидрохлорида согласно требованиям ОФС «Однородность дозирования».

**Распадаемость**. Не более 30 мин с использованием дисков. Определение проводят в соответствии с ОФС «Распадаемость таблеток и капсул».

**Растворение**. Через 45 мин в раствор должно перейти не менее 75 % пиридоксина гидрохлорида и не менее 75 % тиамина гидрохлорида. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Растворение для твердых дозированных лекарственных форм» по методике «Испытания и интепретация результатов для препаратов, относящихся к 1 группе твердых дозированных лекарственных форм с использованием прибора типа «Лопастная мешалка».

Условия проведения испытания:

Среда растворения – искусственный желудочный сок;

Объем среды растворения – 900 мл;

Скорость вращения мешалки – 50 об/мин.

*Искуственный желудочный сок.* В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 2,0 г натрия хлорида, растворяют в воде, прибавляют 8 мл 1 М раствора хлористоводородной кислоты, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

В сосуд для растворения помещают одну таблетку, через 45 мин отбирают пробу раствора объемом 10 мл и фильтруют с помощью шприцевого мембранного фильтра с размером пор 0,45 мкм.

Далее определение пиридоксина гидрохлорида и тиамина гидрохлорида, высвободившихся в среду растворения, проводят методом ВЭЖХ.

\*Стандартные образцы, хроматографические условия, приготовление растворов и реактивов указаны в разделе «Количественное определение».

Проводят определение проверки пригодности хроматографической системы по хроматограммам калибровочных растворов стандартных образцов.

*Приготовление калибровочных растворов стандартных образцов*

*Приготовление исходного раствора стандартного образца пиридоксина гидрохлорида*. В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают около 28,0 мг (точная навеска) стандартного образца пиридоксина гидрохлорида, растворяют в 30-40 мл искусственного желудочного сока, доводят объем раствора до метки этим же растворителем и перемешивают.

*Приготовление исходного раствора стандартного образца тиамина гидрохлорида.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают около 30,0 мг (точная навеска) стандартного образца тиамина, растворяют в 60-80 мл искусственного желудочного сока, доводят объем раствора до метки этим же растворителем и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

*Рабочий калибровочный раствор № 1.* 2,0 мл исходного раствора стандартного образца пиридоксина гидрохлорида и 2,0 мл исходного раствора стандартного образца тиамина гидрохлорида помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят искуственным желудочным соком до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

*Рабочий калибровочный раствор № 2.* 3,0 мл исходного раствора стандартного образца пиридоксина гидрохлорида и 3,0 мл исходного раствора стандартного образца тиамина гидрохлорида помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят искуственным желудочным соком до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

*Рабочий калибровочный раствор № 3.* 4,0 мл исходного раствора стандартного образца пиридоксина гидрохлорида и 4,0 мл исходного раствора стандартного образца тиамина гидрохлорида помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят искуственным желудочным соком до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

Условия хроматографирования калибровочных растворов

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| № калибровочного раствора | Число ввода калибровочных растворов (не менее) | Длина волны детектирования, нм |
| 1 | 3 | 245 и 292 |
| 2 | 3 | 245 и 292 |
| 3 | 3 | 245 и 292 |

*Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:*

- разрешение между пиками пиридоксина и тиамина на хроматограммах калибровочных растворов стандартных образцов № 1, 2, 3 – не менее 2,0;

- факторы ассиметрии пиков *(As)* пиридоксина и тиамина на хроматограммах калибровочных растворов стандартных образцов 1,2,3 при длине волны детектирования 245 нм для тиамина и 292 нм для пиридоксина – соответственно не менее 0,5 и не более 1,5;

- относительное стандартное отклонение площадей пиков пиридоксина и тиамина, рассчитанное не менее чем по трем хроматограммам каждого из трех калибровочных растворов стандартных образцов при длине детектирования 245 нм для тиамина и 292 нм для пиридоксина – не более 2,0 %.

- эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пикам пиридоксина и тиамина на хроматограммах калибровочных растворов стандартных образцов 1,2,3 при детектировании 245 нм для тиамина и 292 нм для пиридоксина – не менее 2000 теоретических тарелок;

Значение содержания пиридоксина гидрохлорида (Хп) в мг/мл для калибровочного графика вычисляют по формуле:

 Хп = $\frac{Мп∙Рп∙Vп}{50∙50}$ ,

где: Мп – навеска СО пиридоксина гидрохлорида, мг;

 Рп – содержание пиридоксина гидрохлорида в СО, мг/мг;

 Vп – объем исходного раствора СО пиридоксина гидрохлорида, взятый для приготовления калибровочного раствора, мл

Значение содержания тиамина гидрохлорида (Хт) в мг/мл для калибровочного графика вычисляют по формуле:

 Хт = $\frac{Мт ∙ Рт ∙ \left(100-В\right) ∙ Vт}{100∙50∙50}$ ,

где: Мт - навеска СО тиамина гидрохлорида, мг;

 Рт – содержание тиамина гидрохлорида (на безводное вещество) в СО, мг/мг;

 В – содержание воды в СО тиамина гидрохлорида, в %;

 Vт – объем исходного раствора СО тиамина гидрохлорида, взятый для приготовления калибровочного раствора, мл.

Последовательно хроматографируют не менее трех раз каждый калибровочный раствор стандартных образцов 1, 2, 3 и вычисляют значения площадей пиков пиридоксина и тиамина на хроматограммах каждого калибровочного раствора.

 *Испытуемый раствор*. 5,0 мл испытуемого образца из среды растворения и отфильтрованный через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм, помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора искусственным желудочным соком до метки и перемешивают.

Испытуемый раствор хроматографируют не менее трех раз и рассчитывают среднее значение площадей пиков пиридоксина и тиамина на хроматограммах испытуемого раствора.

 С помощью программного обеспечения хроматографического оборудования вычисляют содержание пиридоксина гидрохлорида и тиамина гидрохлорида в испытуемом растворе в мг/мл.

Содержание пиридоксина гидрохлорида (Пг) и тиамина гидрохлорида (Тг), высвободившегося в среду растворения в процентах вычисляют по формуле:

 Пг (Тг) = $\frac{Хп ∙V∙25∙100}{Вп∙5}$ ,

где: Хп - содержание пиридоксина гидрохлорида (тиамина гидрохлорида) в испытуемом растворе;

 V – объем среды растворения, мл;

Вп – номинальное содержание пиридоксина гидрохлорида (тиамина гидрохлорида) в одной таблетке, мг.

Результаты испытания считаются удовлетворительными, если количество пиридоксина гидрохлорида и тиамина гидрохлорида высводившихся в среду растворения соответствуют критериям указанным в ОФС «Растворение для твердых дизированных лекарственных форм» стадии S1, S2 S3.

 **Микробиологическая чистота.** Препарат должен соответствовать требованиям ОФС «Микробиологическая чистота». Категория 3А.

**Количественное определение**

Определение проводят методом ВЭЖХ.

***Пиридоксина гидрохлорид и Тиамина гидрохлорид***

*Подвижная фаза.* Буферный раствор рН 2,2 смешивают с метанолом для хроматографии в соотношении 65:35.

 *Приготовление буферного раствора рН 2,2.* В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 1,74 г калия гидрофосфата (безводного) и 2,0 г натрия гексансулфоната растворяют в 900 - 950 мл воды для хроматографии, устанавливают рН раствора ортофосфорной кислотой 85 % до 2,2 ± 0,1, доводят объем раствора водой до метки, перемешивают и фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм. Раствор хранят при температуре от 2 до 8 °С в течение 7 сут.

*Испытуемый раствор.* Взвешивают 10 таблеток препарата и определяют среднюю массу таблетки (Мср). Далее таблетки измельчают и растирают в ступке до мелкодисперстного порошка. Около 460,0 мг (точная навеска) порошка помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 80 – 90 мл 0,1 М раствора хлористоводородной кислоты, растворяют в течение 15 мин на ультразвуковой бане, охлаждают до комнатной температуры и доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают. Раствор фильтруют с помощью шприцевого мембранного фильтра с размером пор 0,45 мкм, затем 1 мл фильтрата помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора 0,1 М раствором хлористоводородной кислоты до метки и перемешивают.

*Приготовление исходного стандартного раствора пиридоксина гидрохлорида.* Около 50 мг (точная навеска) СО пиридоксина гидрохлорида помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 15-20 мл 0,1 М растворе хлористоводородной кислоты и доводят объем раствора до метки тем же растворителем и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

*Приготовление исходного стандартного раствора тиамина гидрохлорида.* Около 53 мг (точная навеска) СО тиамина гидрохлорида помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 30-40 мл 0,1 М растворе хлористоводородной кислоты и доводят объем раствора до метки тем же растворителем и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

*Приготовление смешанного стандартного раствора пиридоксина гидрохлорида и тиамина гидрохлорида.* 1мл исходного стандартного раствора пиридоксина гидрохлорида и 1 мл исходного стандартного раствора тиамина гидрохлорида помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора 0,1 М раствором хлористоводородной кислоты до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

*Хроматографические условия анализа*

Колонка – стальная колонка 250 х 4,6 мм, заполненная пористым сорбентом силикагель с привитой октадецильной фазой (С18), размером зерен 5 мкм

Тип элюирования – изократический

Скорость потока – 1,0 мл/мин

Температура колонки – 40 ºС

Детектор – УФ, детектирование при 2-х длинах волн: 245 и 292

Объем вводимой пробы -10 мкл

Время хроматографирование – 15 мин

Проверку пригодности хроматографической системы проводят по хроматограммам раствора стандартных образцов не менее 5 раз.

Условия, при которых хроматографическая система считается пригодной, указаны в разделе «Растворение».

Проводят хроматографирование попеременно испытуемого и стандартных растворов, регистрируя хроматограммы при 2-х длинах волн: при 292 нм для пиридоксина гидрохлорида и при 245 нм для тиамина гидрохлорида.

Содержание пиридоксина гидрохлорида (Хп) в таблетке в миллиграммах вычисляют по формуле:

 Хп = $\frac{Sp∙Mр∙Pco∙1∙100∙50∙Mср}{Sco∙25∙50∙1∙m}$ ,

где: Sp – среднее значение площади пика пиридоксина на хроматограммах испытуемого раствора, полученных при длине волны 292;

 Мр – навеска СО пиридоксина гидрохлорида, мг;

 Мср – средняя масса таблетки пиридоксина гидрохлорида, мг;

 Рсо – содержание пиридоксина гидрохлорида в СО пиридоксина гидрохлорида, мг/мг;

Sсо – среднее значение площади пика пиридоксина гидрохлорида на хроматограммах раствора СО, полученных при длине волны 292 нм;

 m- навеска порошка растертых таблеток, мг.

Содержание тиамина гидрохлорида (Хт) в таблетке в миллиграммах вычисляют по формуле:

 Хт = $\frac{St∙Mt∙Pt∙(100-W)∙1∙100∙50∙Mср}{Sco∙100∙50∙50∙1∙m}$

где: St – среднее значение площади пика тиамина на хроматограммах испытуемого раствора, полученных при длине волны 245;

 Мt – навеска СО тиамина гидрохлорида, мг;

 Мср – средняя масса таблетки тиамина гидрохлорида, мг;

 Рt – содержание тиамина (на безводное вещество) в СО тиамина гидрохлорида;

Sсо – среднее значение площади пика тиамина гидрохлорида на хроматограммах раствора СО, полученных при длине волны 292 нм;

 m- навеска порошка растертых таблеток;

 W- содержание воды в СО тиамина гидрохлорида, %.

*Цианокобаламин*

*Подвижная фаза.* Смешивают метанол для жидкостной хроматографии и 0,05 М раствор натрия гидрофосфата в соотношении 1:3. Раствор хранят при температуре 15 – 25 °С в течение 1 мес.

*Приготовление 0,05 М раствора динатрия гидрофосфата рН 3,5 ± 0,1.* В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 7,1 г динатрия гидрофосфата (в пересчете на безводный динатрия гидрофосфат), растворяют в воде, устанавливают рН раствора ортофосфорной кислотой 85 % до 3,5 ± 0,1, доводят объем раствора водой до метки, перемешивают и фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм. Раствор хранят при температуре от 2 до 8 °С в течение 7 сут.

*Испытуемый раствор.* Около 460 мг (точная навеска) порошка растертых таблеток препарата помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, добавляют 6-8 мл подвижной фазы и растворяют в течение 15 мин на ультразвуковой бане. Далее раствор охлаждают до комнатной температуры, доводят объем раствора до метки подвижной фазой и перемешивают. Раствор фильтруют с помощью шприцевого мембранного фильтра с размером пор 0,45 мкм. образец для хроматографирования помещают в емкости из темного стекла.Раствор используют свежеприготовленным.

*Раствор стандартного образца*. Около 17 мг (точная навеска) СО цианокобаламина помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в подвижной фазе, доводят объем раствора тем же растворителем и перемешивают. Образец для хроматографирования помещают в емкости из темного стекла. Раствор используют свежеприготовленным.

*Хроматографические условия*

Колонка – стальная колонка размером 250 х 4,6 мм, сорбент – пористый силикагель с привитой октадецильной фазой (С18) или другая альтернативная, удовлетворяющая требованиям пригодности хроматографической системы;

Тип элюирования – изократический;

Скорость потока – 1,0 мл/мин;

Температура колонки - 22±2 ºС;

Детектор – УФ, детектирование при длине волны 361 нм;

Объем вводимой пробы – 20 мкл;

Время хроматографирования – 15 мин.

*Пригодность хроматографической системы*

Проверку пригодности хроматографической системы проводят по хроматограммам раствора стандартного образца. Раствор стандартного образца хроматографируют не менее 5 раз.

Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

- эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику цианокобаламина на хроматограмме раствора стандартного образца – не менее 2000 теоретических тарелок;

- фактор ассиметрии *(As)* пика цианокобаламина на хроматограмме раствора стандартного образца – не менее 0,7 и не более 1,5;

- относительное стандартное отклонение площадей пиков цианокобаламина, рассчитанное не менее чем по пяти хроматограммам раствора стандартного образца – не более 2, 0 %.

Хроматографируют попеременно испытуемый и стандартный раствор, а затем вычисляют содержание цианокобаламина (Хц) в таблетке в миллиграммах по формуле:

 Хц = $\frac{Sц∙Мсо∙Рц∙(100-W)∙1∙10∙Мср}{Sco ∙100∙25∙25∙1∙m}$,

где: Sц – среднее значение площади пика цианокобаламина на хроматограммах испытуемого раствора, полученных при длине волны 361 нм;

 Мсо – навеска стандартного образца цианокобаламина, мл;

 Рц – содержание цианокобаламина (на безводное вещество) в стандартном образце цианокобаламина, в мг/мг;

 Мср –средняя масса таблетки, мг;

 Sco - среднее значение площади пика цианокобаламина на хроматограммах стандартного образца, полученных при длине волны 361 нм;

 m – навеска порошка, мг.

 Хранение. В защищенном от света месте при температуре не выше 25º С в соответствии с ОФС «Хранение лекарственны средств».