**\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_**

**Интерферон альфа-2b + ФС**

**метронидазол + флуконазол,**

**суппозитории вагинальные Вводится впервые**

**\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на комбинированный препарат интерферон альфа-2b + метронидазол + флуконазол, суппозитории вагинальные. Действующими веществами препарата являются интерферон человеческий рекомбинантный альфа-2b типа (ИНФ α-2b), синтезированный генетически модифицированным штаммом бактерии *Escherichia coli*, метронидазол и флуконазол.

В состав препарата входят вспомогательные вещества.

ПРОИЗВОДСТВО

Производство препарата должно отвечать требованиям ОФС «Биотехнологические лекарственные препараты», ОФС «Лекарственные средства, полученные методами рекомбинантных ДНК», ОФС «Интерфероны» и ОФС «Суппозитории».

ИСПЫТАНИЯ

**Описание.** Суппозитории белого или белого с желтоватым оттенком цвета, форма цилиндрическая с заостренным концом.

**Подлинность.** Определяют по наличию ИНФ α-2b, метронидазола и флуконазола и борной кислоты. Испытание проводят двумя методами.

*ИНФ α-2b*. Должен представлять собой интерферон альфа-2. Определение проводят методом нейтрализации противовирусной активности ИНФ *α*-2 анти альфа-интерфероновыми антителами, в соответствии с ОФС «Биологические методы оценки подлинности и специфической активности лекарственных средств на основе интерферона альфа», раздел «Подлинность».

Испытание проводят при следующих условиях:

|  |  |
| --- | --- |
| культура клеток | *MDBK* (клетки почек быка) или другая, в соответствии с ОФС «Биологические методы оценки подлинности и специфической активности лекарственных средств на основе интерферона альфа» |
| индикаторный вирус | вирус везикулярного стоматита *VSV*, штамм «Индиана» |
| стандартный образец ИНФ *α*-2 *b* | 70 000 МЕ/мл  |
| нейтрализующие антитела | поликлональные анти альфа-интерфероновые |

Примечание

Приготовление испытуемого образца. Из 5 упаковок отбирают 10 суппозиториев, объединяют в одну пробу и измельчают. В колбу вместимостью 50 мл помещают навеску препарата 2 г, доводят до 20 мл поддерживающей средой, нагревают на водяной бане в течение 20 -25 мин при температуре 37 ºС. Используют разведения 1:10, 1:100, 1:500.

*Метронидазол.* Время удерживания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора должно соответствовать времени удерживания пика раствора стандартного образца (СО) метронидазола. Определение проводят методом высокоэффективной жидкостной хроматографии по разделу «Количественное определение».

*Флуконазол*. Время удерживания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора должно соответствовать времени удерживания пика раствора стандартного образца (СО) флуконазола. Определение проводят методом высокоэффективной жидкостной хроматографии по разделу «Количественное определение».

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

**Растворение.** Не более 60 мин. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Растворение для твердых дозированных лекарственных форм».

**Посторонние примеси.** На хроматограмме испытуемого раствора площадь пика 2-метил-4(5)-нитроимидазола не должна превышать площади пика метронидазола (не более 0,5 %); любой единичной неидентифицированной примеси - не более 0,5 % от площади пика метронидазола; суммы примесей - не более 2 % от площади пика метронидазола. Определение проводят методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в соответствии с ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография». Условия хроматографирования указаны в разделе «Количественное определение». Хроматографируют по 20мкл испытуемого раствора и раствора СО 2-метил-4(5)-нитроимидазола (0,005 мг/мл).

Примечание

Приготовление раствора СО 2-метил-4(5)-нитроимидазола (0,005 мг/мл).

Около 12,5 мг (точная навеска) СО 2-метил-4(5)-нитроимидазола помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в подвижной фазе и доводят объем раствора тем же растворителем до метки. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 1,0 мл полученного раствора, доводят объем до метки подвижной фазой и перемешивают.

**Микробиологическая чистота.** Должен соответствовать категории6.3.А. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота».

**Специфическая активность.** От 80 до 125 % от номинальной активности в суппозитории.

Определение проводят биологическим методом - по способности препарата подавлять цитопатическое действие вируса на культуре клеток, в соответствии с ОФС «Биологические методы оценки подлинности и специфической активности лекарственных средств на основе интерферона альфа». Условия испытания указаны в разделе «Подлинность».

**Количественное определение.**

*Метронидазол (C6H9N3O3).* От 225 до 275 мг в 1 суппозитории.

*Флуконазол* *(C13H12F2N6O)*. От 135 до 165 мг в 1 суппозитории.

Определение метронидазола и флуконазола проводят одновременно методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в соответствии с ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография».

Условия испытания.

*Подвижная фаза (ПФ).* Раствор А - раствор В 85:15

*Раствор А*. 0,5 % водный раствор уксусной кислоты. В колбу вместимостью 1000 мл вносят воду и 4,8 мл уксусной кислоты ледяной, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

*Раствор В.* Ацетонитрил для ВЭЖХ.

*Испытуемый раствор*. Около 2,0 г (точная навеска) предварительно измельченных пяти суппозиториев помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 30 мл ПФ, помещают на ультразвуковую баню на 5 мин, периодически помешивая. Доводят объем раствора тем же растворителем до метки и интенсивно встряхивают в течение 10 мин. Полученный раствор в объеме 5,0 мл помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора ПФ до метки и перемешивают.

*Раствор СО метронидазола (1,00 мг/мл).* Около 25,0 мг (точная навеска) СО метронидазола помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 20 мл ПФ, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают.

*Раствор СО флуконазола (0,60 мг/мл).* Около 30,0 мг (точная навеска) СО флуконазола помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 20 мл ПФ, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают.

*Раствор СО 2-метил-4(5)-нитроимидазола (0,40 мг/мл).* Около 10,0 мг (точная навеска) СО 2-метил-4(5)-нитроимидазола помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 20 мл ПФ, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают.

*Раствор бензимидазола (0,008 мг/мл).* Около 10, мг (точная навеска) бензимидазола помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 20 мл ПФ, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают. 1 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора ПФ до метки и перемешивают.

*Раствор для проверки пригодности хроматографической системы.* Смешивают 1,0 мл раствора СО метронидазола, 0,5 мл раствора СО флуконазола и 0,25 мл раствора СО 2-метил-4(5)-нитроимидазола. Полученный раствор смешивают с раствором бензимидазола в соотношении 1:1.

Перед использованием все растворы для ВЭЖХ фильтруют через микрофильтр с размером пор 0,45 мкм и дегазируют любым удобным способом.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 4,6 · 150 мм, октадецилсилилсиликагель для хроматографии (С18), 5 мкм; |
| Температура колонки | 40 °С |
| Скорость потока | 1,5 мл/мин |
| Детектор | спектрофотометрический, 260 нм |
| Объём пробы | 20 мкл |

Хроматографируют испытуемые и стандартные растворы.

Время удерживания пика бензимидазола около 1,7 мин, метронидазола - около 2,9 мин, 2-метил-4(5)-нитроимидазола - около 2,4 мин, флуконазола - около 9,6 мин.

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

- *эффективность хроматографической колонки* для пика метронидазола не менее 4500 теоретических тарелок;

- *относительное стандартное отклонение* от средней площади пика на хроматограмме раствора СО метронидазола должно быть не более 1 %; СО флуконазола - не более 1,5 % (5 определений);

- *фактор асимметрии* для метронидазола- не более 1,4, для флуконазола - не более 1,2.

Содержание метронидазола в 1 суппозитории в мг (*Х*) вычисляют по формуле:

$$Х=\frac{S\_{1}∙50∙5∙m\_{0}∙P∙b}{S\_{0}∙m \_{1}∙25∙100}=\frac{S\_{1}∙m\_{0}∙P∙b}{S\_{0}∙m \_{1}∙10}$$

|  |  |
| --- | --- |
| где: |  |
| *S0 -* | площадь пика метронидазола на хроматограмме раствора СО; |
| *S1 -* | площадь пика метронидазола на хроматограмме испытуемого раствора; |
| *m0 -* | навеска стандартного образца метронидазола, мг; |
| *m1 -* | навеска препарата, г; |
| *P -* | содержание метронидазола в стандартном образце, % |
| *b -* | средняя масса 1 суппозитория, г |

Содержание флуконазола в 1 суппозитории в мг (*Х*) вычисляют по формуле:

$$Х=\frac{S\_{1}∙50∙5∙m\_{0}∙P∙b}{S\_{0}∙m \_{1}∙25∙100}=\frac{S\_{1}∙m\_{0}∙P∙b}{S\_{0}∙m \_{1}∙10}$$

|  |  |
| --- | --- |
| где: |  |
| *S0 -* | площадь пика флуконазола на хроматограмме раствора СО; |
| *S1 -* | площадь пика флуконазола на хроматограмме испытуемого раствора; |
| *m0 -* | навеска стандартного образца флуконазола, мг; |
| *m1 -* | навеска препарата, г; |
| *P -* | содержание флуконазола в стандартном образце, % |
| *b -* | средняя масса 1 суппозитория, г |

*Борная кислота.* Содержание борной кислоты в 1 суппозитории от 360 до 440 мг. Определение проводят алколиметрическим титрованием.

Около 0,625 г (точная навеска) массы пяти растертых суппозиториев помещают в колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 15 мл воды, периодически перемешивают до растворения навески. Затем прибавляют 15 мл 60 % глицерина, предварительно нейтрализованного по фенолфталеину (0,4 мл), перемешивают и титруют 0,1 М раствором натрия гидроксида до появления слабо-розовой окраски. Если при прибавлении еще 5,0 мл глицерина окраска исчезает (через 1-2 мин), снова титруют до появления розовой окраски. Титрование продолжают до тех пор, пока при прибавлении глицерина розовая окраска раствора не перестанет исчезать.

1 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида соответствует 0,006184 г борной кислоты.

**Упаковка и маркировка.** В соответствии с ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств» и ОФС «Лекарственные формы».

**Транспортирование и хранение.** В соответствии с ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств» и ОФС «Хранение лекарственных средств» при температуре от 2 до 8 °С.