**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |
| --- |
|  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Кокарбоксилазы гидрохлорид****Кокарбоксилаза** |  | **ФС** |
| ***Cocarboxylasi hydrochloridum*** |  | **Взамен ФС 42-2381-98** |

|  |
| --- |
|  |

|  |
| --- |
| Настоящая фармакопейная статья распространяется на Кокарбоксилазы гидрохлорид, субстанцию. 3-[(4-амино-2-метил-5-пиримидинил)метил]-5-(2-гидроксиэтил)-4-метилтиазолио-О-дифосфоната гидрохлорид |
|    |
| С12H18N4O7P2S·HCl  | М.м. 460,8 |

Содержит не менее 98,5 % и не более 101,0 % кокарбоксилазы гидрохлорида (С12H18N4O7P2S·HCl) в пересчете на сухое вещество. Сырье, используемое для производства субстанции, должно соответствовать требованиям ОФС «Фармацевтические субстанции», «Фармацевтические субстанции животного происхождения» и нижеприведенным требованиям.

**Описание.** Должна соответствовать требованиям ОФС «Порошки».

**Подлинность**

***ИК-спектрометрия***

Инфракрасный спектр субстанции, снятый в диске с калия бромидом, в области от 4000 до 400 см-1 по положению полос поглощения должен соответствовать спектру стандартного образца кокарбоксилазы гидрохлорида.

***Спектрофотометрия***

*Испытуемый раствор (0,002 %)*. 2,0 мг субстанции помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в небольшом количестве хлористоводородной кислоты раствора 0,1 М, доводят объем раствора хлористоводородной кислоты раствором 0,1 М до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

Спектр поглощения испытуемого раствора в области от 220 до 350 нм должен иметь максимум поглощения при 246 ± 2 нм и плечо в интервале от 255 до 268 нм (кокарбоксилазы гидрохлорид).

***Качественные реакции***

*Окислительная смесь*. 10,0 мг калия феррицианида помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 1,0 мл воды, доводят объем раствора натрия гидроксида раствором 15 % до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

*1.* 10 мг субстанции растворяют в 5 мл воды, прибавляют 3 мл окислительной смеси, доводят pH раствора до 3 (по универсальной индикаторной бумаге) хлористоводородной кислотой 25 %. В ультрафиолетовом свете при длине волны 254 нм должна наблюдаться синяя флуоресценция, исчезающая при подкислении хлористоводородной кислотой той же концентрации и вновь возникающая при подщелачивании до pH 3 натрия гидроксида раствором 15 % (*тиамин*).

*2.* 10 мг субстанции растворяют в 3 мл азотной кислоты концентрированной и кипятят в течение 5 мин. После охлаждения прибавляют 10 мл воды. Полученный раствор должен давать характерную реакцию В на *фосфаты* (ОФС «Общие реакции на подлинность»).

*3.* 20 мг субстанции растворяют в 2 мл воды; раствор должен давать характерную реакцию на *хлориды* (ОФС «Общие реакции на подлинность»).

**Температура плавления.** От 230 до 240 ºС (с разложением). Скорость нагревания – 5 ºС/мин. В соответствии с требованиями ОФС «Температура плавления» (метод 1).

**Растворимость.**Легко растворима в воде, практически нерастворима в спирте 96 %. В соответствии с требованиями ОФС «Растворимость».

**Прозрачность.** 2,5 % раствор субстанции должен быть прозрачным. В соответствии с требованиями ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей».

1,25 г субстанции помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 20 мл воды, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

**Цветность.** Раствор, полученный в испытании на прозрачность, должен быть бесцветным или выдерживать сравнение с эталоном Y7. В соответствии с требованиями ОФС «Степень окраски жидкостей».

pH. От 1,4 до 1,7. Испытание проводят с 2,5 % раствором в соответствии с требованиями ОФС «Ионометрия» (метод 3).

Родственные примеси

*Фосфотиамин.* Определение проводят методом ВЭЖХ в соответствии с ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография».

Подвижная фаза. 1,36 г калия дигидрофосфата и 2,0 г тетрабутиламмония бромида помещают в колбу и растворяют в 1000 мл воды, доводят pH раствора до 6,8 натрия гидроксида раствором 1 М, прибавляют 80,0 мл метанола и перемешивают. Полученный раствор фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм и дегазируют. Раствор хранят в течение 7 сут. при температуре от 15 до 25 ºС.

Испытуемый раствор. 0,10 г (точная навеска) субстанции помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 80,0 мл подвижной фазы, доводят объем раствора подвижной фазой до метки и перемешивают. Полученный раствор фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм. Раствор используют свежеприготовленным.

Раствор стандартного образца фосфотиамина. Около 0,02 г (точная навеска) стандартного образца фосфотиамина помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 80,0 мл подвижной фазы, доводят объем раствора подвижной фазой до метки и перемешивают. 10,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора подвижной фазой до метки и перемешивают. Полученный раствор фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм. Раствор используют свежеприготовленным.

Раствор для проверки пригодности хроматографической системы. Около 0,01 г фосфотиамина помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 20 мл испытуемого раствора, доводят объем раствора испытуемым раствором до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

*Условия хроматографирования*

Колонка 150 × 4,6, силикагель октадецилсилильный (С18) для хроматографии, 5 мкм;

Температура колонки 25 °С;

Режим

хроматографирования изократический;

Скорость потока

подвижной фазы 1,1 – 1,4 мл/мин;

Детектор спектрофотометрический, 265 нм;

Объем вводимой

пробы 10 мкл;

Время проведения

анализа 20 мин.

*Относительное время удерживания соединений.* Дифосфорный эфир тиамина (кокарбоксилаза) - 1 (около 3 мин), фосфотиамин – 0,67.

Перед проведением анализа колонку уравновешивают подвижной фазой в течение 20 мин. Хроматографируют раствор для проверки пригодности хроматографической системы.

Пригодность хроматографической системы. Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

*– эффективность хроматографической колонки*, рассчитанная по пику дифосфорного эфира тиамина, должна быть не менее 1000 теоретических тарелок;

 *– разрешение (R)* между пиками дифосфорного эфира тиамина и фосфотиамина должно быть не менее 1,0;

*– относительное стандартное отклонение* площади пика дифосфорного эфира тиамина должно быть не более 2,0 % (6 повторных введений).

Хроматографируют испытуемый раствор и раствор стандартного образца фосфотиамина, получая не менее трех хроматограмм.

Содержание фосфотиамина в субстанции в процентах (X) вычисляют по формуле:

X = $\frac{S ∙ a\_{o }∙ 10 ∙ 100 ∙ P }{S\_{o}∙a ∙ 100 ∙ 100 }$ = $\frac{S ∙ a\_{o } ∙ P }{S\_{o}∙a ∙ 10 }$,

где: S *–* площадь пика фосфотиамина на хроматограмме испытуемого раствора;

So *–* площадь пика фосфотиамина на хроматограмме раствора стандартного образца фосфотиамина;

а *–* навеска субстанции, г;

аo *–* навеска стандартного образца фосфотиамина, г;

Р *–* содержание основного вещества в стандартном образце фосфотиамина, %;

*Допустимое содержание примесей.* Содержание фосфотиамина должно быть не более 3,0 %.

***Фосфаты.*** Определение проводят методом спектрофотометрии в соответствии с ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях».

*Испытуемый раствор.* Около 0,1 г (точная навеска) субстанции помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 10 мл воды, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают.

*Стандартный раствор.* Около 0,35 г (точная навеска) стандартного образца калия дигидрофосфата, предварительно высушенного при 110 °С до постоянной массы, помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, растворяют в 200 мл воды, прибавляют 10,0 мл серной кислоты разведенной 16 %, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. 10 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

1 мл стандартного раствора содержит 0,000035 г КН2Р04, что соответствует 0,0000244 г РО43-.

*Ацетатный буферный раствор pH 4,0*. В мерную колбу вместимостью 200 мл помещают 10 мл уксусной кислоты раствора 1 М, 25 мл натрия ацетата раствора 0,1 М, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Раствор хранят в течение 6 мес при температуре не выше 25 ºС.

В три мерные колбы вместимостью 25 мл помещают: в первую 5,0 мл испытуемого раствора (раствор А), во вторую 2,0 мл раствора калия дигидрофосфата и 3,0 мл воды (раствор Б), в третью - 5,0 мл воды (раствор В). В каждую колбу прибавляют по 10,0 мл ацетатного буферного раствора с pH 4,0, 2,5 мл аммония молибдата раствор в серной кислоте концентрированной, 2,5 мл аскорбиновой кислоты раствора 1 %, и доводят объем раствора ацетатным буферным раствором с pH 4,0 до метки. Содержимое колб перемешивают и точно через 10 мин после прибавления аскорбиновой кислоты раствора 1 % измеряют оптические плотности растворов А и Б на спектрофотометре в максимуме поглощения при длине волны 740 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм против раствора сравнения. В качестве раствора сравнения используют раствор В.

Содержание фосфатов (Х) в процентах в пересчете на сухое вещество вычисляют по формуле:

Х = $\frac{A\_{А}∙a\_{0}25∙50∙10∙2∙0,698∙100∙100}{A\_{Б}∙a∙5∙1000∙100∙25∙(100-W)}$,

где: *AА* – оптическая плотность раствора А;

*АБ* – оптическая плотность раствора Б;

*a0* – навеска стандартного образца калия дигидрофосфата, г;

*a* – навеска субстанции, г;

*W* – содержание влаги в субстанции, %;

0,698 – коэффициент пересчета калия дигидрофосфата на фосфат-ионы.

*Допустимое содержание примесей.* Содержание фосфатов должно быть не более 0,6 % в пересчете на сухое вещество.

**Потеря в массе при высушивании.** Не более 0,8 %. Масса навески – около 0,5 г (точная навеска). В соответствии с требованиями ОФС «Потеря в массе при высушивании» (способ 1).

**Тяжелые металлы.** Не более 0,001 %. Сульфатная зола из 1,0 г субстанции должна выдерживать испытания на тяжелые металлы, в соответствии с требованиями ОФС «Тяжелые металлы», раздел «Определение тяжелых металлов в зольном остатке органических лекарственных средств».

 **Остаточные органические растворители.** В соответствии с требованиями ОФС «Остаточные органические растворители».

**Бактериальные эндотоксины*.*** Не более 0,5 ЕЭ в 1 мг кокарбоксилазы гидрохлорида. В соответствии с требованиями ОФС «Бактериальные эндотоксины».

**Микробиологическая чистота.** Должен соответствовать требованиям ОФС «Микробиологическая чистота».

**Количественное определение.** Определение проводят методом титриметрии.

Около 0,2 г (точная навеска) субстанции помещают в колбу и растворяют в 10,0 мл воды. Полученный раствор титруют 0,1 М раствором натрия гидроксида до появления голубого окрашивания (индикатор – 0,2 мл тимолфталеина раствора 0,1 %).

Параллельно проводят контрольный опыт.

Содержание кокарбоксилазы гидрохлорида в субстанции в процентах (X) в пересчете на сухое вещество рассчитывают по формуле:

*X* = $\frac{K ∙ V ∙ 0,01536 ∙ 100 ∙ 100}{a ∙ (100 - W)} $− *X*1 · $\frac{0,01536}{0,0047}$,

где: К – поправочный коэффициент к титру 0,1 М раствора натрия гидроксида;

V – количество 0,1 М раствора натрия гидроксида, израсходованного на титрование, мл;

а – навеска субстанции, г;

Х1 – содержание фосфат-иона в субстанции, %;

W – содержание влаги в субстанции, %;

0,01536 – количество кокарбоксилазы гидрохлорида, соответствующее 1 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида, г;

0,0047 – количество фосфат-иона, соответствующее 1 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида.

 Х**ранение.** В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственных средств».