**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

[Строка 2: свободная, 1,5 интервала]

[Строка 3: свободная, 1,5 интервала]

[Строка 4: свободная, 1,5 интервала]

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |
| --- |
|  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Пиридоксина гидрохлорид+Тиамина нитрат+Цианокобаламин, раствор для внутримышечного введения**  |  | **ФС** |
| **Пиридоксина гидрохлорид+Тиамина нитрат+Цианокобаламин, раствор для внутримышечного введения** |  |  |
| ***Pyridoxinum +Thiaminum +Cyanocobalaminum******solutio intramuscular iniectio***  |  | **Вводится впервые** |

|  |
| --- |
|  |

 Настоящая фармакопейная статья распространяется на лекарственный препарат Пиридоксина гидрохлорид+Тиамина нитрат+Цианокобаламин, раствор для внутримышечного введения.

 Препарат относится к нейротропным витаминам группы В. Препарат содержит от заявленного количества не менее 90 % и не более 121 % тиамина гидрохлорида С12Н17CLN4ОS ·HCl (В1), не менее 90 % и не более 121 % пиридоксина гидрохлорида С8Н11NО3 ˑНCL(В6,) и не менее 90 % и не более 132 % цианокобаламин C63H88CoN14O14P (B12).

 Препарат должен соответствовать ниже приведенным требованиям и выдерживать испытания, характерные для данной лекарственной формы.

 В состав препарата входят вспомогательные вещества.

 **Описание.** Прозрачная жидкость красного цвета с характерным запахом.

 **Подлинность.** Времена удерживания основных пиков на хроматограммах испытуемых рас­творов должны соответствовать временам удерживания основных пиков на хроматограммах стандартных растворов тиамина гидрохлорида, пиридоксина гидрохлорида и цианокобаламина (раздел «Количественное определе­ние»).

 **Прозрачность.** Препарат должен быть прозрачным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей».

**рН.** От 3,0 до 4,0. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

 **Механические включения**

 *Видимые механические включения*. Должны соответствовать требованиям, указанным в ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

*Невидимые механические включения*.Должны соответствовать требованиям, указанным в ОФС Определение проводят в соответствиис ОФС «Невидимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения».

**Извлекаемый объем.** Не менее номинального. Должен соответствовать требованиямОФС «Извлекаемый объем лекарственных форм для парентерального применения».

**Бактериальные эндотоксины.** Не более 87,5 ЕЭ/мл. Определение, проводят в соответствии с требованиями ОФС «Бактериальные эндотоксины».

 **Стерильность.** Должен быть стерильным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Стерильность».

 **Количественно определение**

Не менее 90 % и не более 121 % тиамина гидрохлорида С12Н17CLN4ОS ·HCl (В1), не менее 90 % и не более 121 % пиридоксина гидрохлорида С8Н11NО3 ˑНCL(В6,), не менее 90 % и не более 132 % цианокобаламина C63H88CoN14O14P (B12) не более 10 % гидроксокобаломин от заявленного количества.

Метод ВЭЖХ

Растворитель.

0,05 М раствор уксусной кислоты.

3,1 г уксусной кислоты ледяной растворяют в 1000 мл воды, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Буферный раствор калия дигидрофосфата pH 3,3.

 27,2 г калия дигидрофосфата (КН2РО4) растворяют в 2000 мл воды, доводят значение pH раствора до 3,3 (± 0,05) (потенциометрически) фосфорной кислотой концентрированной.

Подвижная фаза А

1000 мл буферного раствора калия дигидрофосфата pH 3,3 смешивают с 1000 мл воды, доводят значение pH раствора до 3,3 (± 0,05) фосфорной кис­лотой концентрированной.

Подвижная фаза В

Смешивают 500 мл буферного раствора калия д и гидрофосфата pH 3,3 и 390 г ацетонитрила, доводят значение pH раствора до 3,3 (± 0,05) фосфорной кислотой концентрированной.

Основной стандартный раствор тиамина гидрохлорида и пиридоксина гид­рохлорида

Около 550,0 мг (точная навеска) СО тиамина гидрохлори­да (at) и около 500,0 мг (точная навеска) стандартного образца пиридоксина гидрохлорида (аг) помещают в мерную колбу темного стекла вместимостью 100 мл, растворяют в растворителе, доводят объем раствора растворителем до метки и перемешивают (раствор А), (концентрация тиамина гидрохлорида около 5,5 мг/мл и пиридоксина гидрохлорида около 5 мг/мл).

Основной стандартный раствор цианокобаламина СО 1

Около 60,0 мг (точная навеска) СО цианокобаламина (аз) помещают в мерную колбу темного стекла вместимостью 100 мл, растворяют в растворителе, доводят объем раствора растворителем до метки и перемешивают. 10,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу из

темного стекла вместимостью 100 мл, доводят объем раствора растворителем до метки и перемешивают (раствор В), (концентрация цианокобаламина около 0,06 мг/мл).

Основной стандартный раствор цианокобаламина СО2

Около 300,0 - 350,0 мг (точная навеска) СО цианокобаламина (в зависимости от содержания основного вещества в СО, от 8,75 мкг/мг до 10 мкг/мг) помещают в мерную колбу из темного стекла вместимостью 50 мл, растворяют в растворителе, доводят объем раствора растворителем до метки и перемешивают (раствор В), (концентрация цианокобаламина около 0,06 мг/мл).

Стандартный раствор для количественного определения

10 мл раствора А и 10,0 мл раствора В помещают в мерную колбу темного стекла вместимостью 50 мл, доводят объем раствора растворителем до метки и перемешивают (концентрация тиамина гидрохлорида около 1,1 мг/мл; концентрация пиридоксина гидрохлорида около 1 мг/мл; концентрация цианокобаламина около 0,012 мг/мл).

Испытуемый раствор для количественного определения

1 мл препарата помещают в мерную колбу темного стекла вместимостью 50 мл, доводят объем раствора растворителем до метки и перемешивают (концентрация тиамина гидрохлорида около 1,1 мг/мл; пиридоксина гидрохлорида около 1 мг/мл; цианокобаламина около 0,012 мг/мл).

 \*Растворы стандартных образцов и испытуемого препарата используют све­жеприготовленными.

Хроматографические условия

Колонка: 150 х 4,6 мм, силикагель октадецилсилильный (С18), 5 мкм

Скорость потока:1,4 мл/мин;

Детектор: фотодиодный (PDA)

Длина волны: Тиамина гидрохлорид 285 нм;

 Пиридоксина гидрохлорид 275 нм;

 Цианокобаламин 360 нм;

 Гидроксокобаламин 360 нм

Температура колонки: 30 °С;

Объем пробы: 10 мкл;

Ориентировочные времена удерживания:

Тиамина гидрохлорида от 1,5 до 2,5 мин;

Пиридоксина гидрохлорида от 2,5 до 4,5 мин;

Цианокобаламина от 10 до 15 мин;

Гидроксокобаламин около 8 до10 мин

Время хроматографирования: 24 мин.

Элюирование проводят последующей градиентной программе:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Время | Скорость | % фазы А | % фазы В |
| 0 | 1,4 | 98 | 2 |
| 2 | 1,4 | 98 | 2 |
| 7 | 1,4 | 80 | 20 |
| 11 | 1,4 | 60 | 40 |
| 17 | 1,4 | 98 | 2 |
| 25 | 1,4 | 98 | 2 |

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

Для обеспечения пригодности хроматографической системы допускается изменение содержания ацетонитрила в подвижной фазе.

Вводят стандартный раствор для количественного определения не менее 5 раз.

*Проверка пригодности хроматографической системы:*

- разрешение между пиками пиридоксина гидрохлорида и тиамина гидрохло­рида при длине волны 285 нм должно быть > 7;

- фактор асимметрии для пиков тиамина гидрохлорида и цианокобаламина 0,85 - 1,5; пиридоксина гидрохлорида < 3,0;

- относительное стандартное отклонение площадей пиков тиамина и пиридоксина для 5 повторных вводов стандартного раствора должно быть < 2,0 %;

- эффективность колонки для пиков тиамина и пиридоксина должна быть > 2000 теоретических тарелок; для пика цианокобаламина > 10000.

Вводят в хроматограф по 10 мкл стандартного и испытуемого растворов и записывают хроматограммы.

Содержание тиамина гидрохлорида или пиридоксина гидрохлорида (Х) в 2 мл препарата вычисляют в процентах по формуле:

 X = $\frac{S∙a ∙10∙P∙50∙2}{So∙100∙50∙100∙1}$ = $\frac{S∙a∙P∙0,002}{So}$,

где: S – площадь пика тиамина гидрохлорида (пиридоксина гидрохлорида) на хроматограмме испытуемого раствора;

 So - площадь пика тиамина гидрохлорида (пиридоксина гидрохлорида) на хроматограмме стандартного раствора;

 а – навеска СО тиамина гидрохлорида (пиридоксина гидрохлорида), мг;

P – содержание основного вещества в СО тиамина гидрохлорида (пиридоксина гидрохлорида), %

Содержание цианокобаламина в мг (Х) в 2 мл препарата в процентах при использовании СО 1:

 Х = $\frac{S ∙a3∙10∙10∙P∙50∙2}{So∙100∙10050∙100∙1}$ = $\frac{S ∙a3∙P∙0,0002}{So}$,

Содержание цианокобаламина в мг (Х) в 2 мл препарата в процентах при использовании СО 2:

 Х = $\frac{S ∙a3∙10∙P∙50∙2}{So∙50∙50∙100∙1}$ = $\frac{S ∙a3∙P∙0,004}{So}$ ,

где: S – площадь пика цианокобаламина на хроматограмме испытуемого раствора;

 So - площадь пика цианокобаламинана хроматограмме стандартного раствора;

 а3– навеска СО цианокобаламинана, мг;

P – содержание основного вещества в СО цианокобаламинана, %.

**Родственные примеси**

Родственные примеси (РП)

*Родственные примеси витаминов:* Тиамина гидрохлорида (*В1) и* Пиридоксина гидрохлорида (*В6) :*

Окситиамин - не более 1,0 %;

Любая единичная неидентифицированная примесь - не более 1,0 %;

Сумма всех примесей не более 2 %

*Родственные примеси витамина* цианокобаламин (*В12)*

Сумма неидентифицированных примесей не более 5,5 %

Определение проводят методом ВЭЖХ, по методике, описанной в разделе «Количественное определение».

Стандартный раствор для определения РП

4,0 мл раствора А и 10,0 мл раствора В помещают в мерную колбу темного стекла вместимостью 100 мл, доводят объем раствора растворителем до метки и перемешивают (концентрация тиамина гидрохлорида около 0,22 мг/мл, пиридоксина гидрохлорида около 0,2 мг/мл, цианокобаламина около 0,006 мг/мл)

Испытуемый раствор для определения РП

10,0 мл препарата помещают в мерную колбу темного стекла вместимостью 50 мл, доводят объем раствора растворителем до метки и перемешивают (концентрация тиамина гидрохлорида около 11 мг/мл, пиридоксина гидрохлорида около 10 мг/мл, цианокобаламина около 0,12 мг/мл)

\*Растворы стандартных образцов и испытуемого препарата следует использовать све­жеприготовленными.

Определение родственных примесей проводят при длинах волн:

Родственные примеси витаминов В1 и В6: 245 нм

Родственные примеси витамина В12: 360 нм

Времена удерживания и поправочные коэффициенты:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Родственные примеси** | **Ориентировочное время удерживания (RT)** | **Поправочный коэффициент** | **Относительное время удерживания (RRT)** |
| Окситиамин | Около 5 мин | 2,44 | ~ 2,1 |
| Гидроксокобаламин | Около 8 - 10 мин | 1,79 | ~0.8 |

Проводят дополнительно к описанной в разделе «Количественное определение» испытания пригодности хроматографической системы:

Вводят в колонку стандартный раствор для определения РП:

Требования:

На хроматограмме стандартного раствора для определения родственных примесей (РП):

* Отношение сигнал/шум для цианокобаламина при 360 нм должно быть > 300

Испытуемый раствор для определения РП:

* Разрешение между пиками пиридоксина гидрохлорида и окситиамина на хроматограмме испытуемого раствора при 245 нм должно быть > 2,5;
* Разрешение между пиками гидроксокобаламина и цианокобаламина на хроматограмме испытуемого раствора при 360 нм должно быть > 10;

*Окситиамин и любые единичные неидентифицируемые примеси*

 Содержание окситиамина, а также любых единичных неидентифицирован- ных примесей, родственных тиамину гидрохлорида (*В1) и* пиридоксину гидрохлорида (*В6)* (Х) в процентах в 2 мл препарата вычисляют по формуле:

 Х = $\frac{St∙ai∙P∙4∙Cf∙2∙50}{100∙100∙100∙10∙Sr∙M}$ = 100 $∙ \frac{St∙ai∙P∙Cf∙0,00004}{Sr∙M}$,

где: St - площадь пика родственной примеси на хроматограмме испытуемо­го раствора для определения РП;

SR - площадь пика тиамина гидрохлорида на хроматограмме стандарт­ного раствора для определения РП;

ai - навеска CО тиамина гидрохлорида, мг;

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

Cf - коэффициент корреляции (для окситиамина = 2,44, для любой дру­гой = 1);

М - заявленное содержание тиамина гидрохлорида в препарате (110

 мг);

2 - объем препарата в ампуле.

 \* При расчете не учитывают пики растворителя.

*Сумма всех примесей, родственных Тиамину гидрохлорида и Пиридоксину гидрохлорида*

Сумму всех родственных примесей рассчитывают путем сложения содер­жания примеси окситиамина и единичных неидентифицированных приме­сей. Не учитывают примеси с содержанием менее 0,1%.

*Родственные примеси цианокобаламина*

 *Гидроксокобаламин*

Содержание гидроксокобаламина (X) в мг в 2 мл препарата при

использовании СО 1 вычисляют по формуле:

 Х = $ \frac{St∙a3∙P∙Cf ∙10∙10∙50∙2}{Sr∙100∙100∙100∙100∙10 }$ = $\frac{St ∙a3∙P∙Cf∙0,00001}{Sr}$

Содержание гидроксокобаламина (X) в мг в 2 мл препарата при

использовании СО 2 вычисляют по формуле:

 Х = $\frac{St∙a3∙P∙Cf∙10∙50∙2}{Sr∙50∙100∙100∙10}$ = $\frac{St∙a3∙P∙Cf∙0,0002}{Sr}$

где: St – площадь пика гидроксокобаламина на хроматограмме испытуемого раствора для определения РП;

Sr - площадь пика цианокобаламина на хроматограмме стандартного раствора для определения РП;

 a3 – навеска СО цианокобаламина в основном стандартном растворе (раствор В), мг;

P – содержание основного вещества в СО цианокобаламина, %;

Cf – 1,79 коэффициент корреляции (корректирует разницу в длинах волн, т.к. максимум поглощения для гидроксокобаламина наблюдается при длине волны 350 нм.

*Сумма неидентифицируемых примесей, родственных цианокобаламину*

Вычисляют содержание единичной неидентифицируемой примеси (Х) в процентах по приведенным ниже формулам:

При использовании СО 1:

 Х = $\frac{St∙a3∙P∙10∙10∙2∙50}{Sr∙M∙100∙100∙100∙100∙10}$ = $\frac{St∙a3∙P∙0,00001}{Sr∙M}$

При использовании СО 2:

 X = $\frac{St∙a3∙P∙10∙2∙50}{Sr∙M∙100∙50∙100∙10}$ = $\frac{St∙a3∙P∙0,0002}{Sr∙M}$

где: St – площадь пиков РП на хроматограмме испытуемого раствора для определения РП;

Sr - площадь пика цианокобаламина на хроматограмме стандартного раствора для определения РП;

 a3 – навеска СО цианокобаламина в основном стандартном растворе (раствор В), мг;

P – содержание основного вещества в СО цианокобаламина, %;

 М – заявленное содержание цианокобаламина в препарате (1,2 мг);

 2 – объем препарата в ампуле, мл.

Сумму примесей вычисляют путем сложения содержания единичных примесей. Не учитывают примеси с содержанием менее 0,1 %.

При расчете не учитывают пики растворителя, тиамина гидрохлорида, окситиамина, пиридоксина гидрохлорида.

**Хранение.** При температуре от 2 до 8 ºС. Допускается хранение препарата при температуре не выше 25 ºС в течение 14 дней. Определение проводят в соответствии с ОФС «Хранение лекарственных препаратов».