МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |
| --- |
|  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Изониазид+Пиразинамид+Рифампицин+Этамбутола гидрохлорид, таблетки** |  | **ФС** |
| **Изониазид+Пиразинамид+Рифампицин+Этамбутол, таблетки** |  |  |
| **Isoniazidum+Pyrazinamidum+Rifampicinum+ Ethambutoli hydrochloridum, tabulettae** |  | **Вводится впервые** |

|  |
| --- |
|  |

Настоящая фармакопейная статья распространяется на лекарственный препарат изониазид+пиразинамид+рифампицин+этамбутола гидрохлорид, таблетки (таблетки, покрытые оболочкой; таблетки, покрытые плёночной оболочкой). Препарат должен соответствовать требованиям ОФС «Таблетки» и нижеприведённым требованиям.

Содержит не менее 90,0 % и не более 110,0 % от заявленного количества изониазида C6H7N3O.

Содержит не менее 90,0 % и не более 110,0 % от заявленного количества пиразинамида C5H5N3O.

Содержит не менее 90,0 % и не более 110,0 % от заявленного количества рифампицина C43Н58N4O12.

Содержит не менее 90,0 % и не более 110,0 % от заявленного количества этамбутола гидрохлорида C10H24N2O2·2HCl.

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

**Подлинность**

*1. ВЭЖХ.* Время удерживания трёх основных пиков на хроматограмме испытуемого раствора должно соответствовать времени удерживания пиков изониазида, пиразинамида и рифампицина на хроматограмме стандартного раствора (раздел «Количественное определение. 1. Изониазид, пиразинамид, рифампицин»).

*2. ВЭЖХ.* Время удерживания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора должно соответствовать времени удерживания пика этамбутола на хроматограмме раствора стандартного образца этамбутола гидрохлорида (раздел «Количественное определение. 2. Этамбутола гидрохлорид»).

**Растворение.** Определение проводят в соответствии с ОФС «Растворение для твердых дозированных лекарственных форм».

*Условия испытания*

|  |  |
| --- | --- |
| Аппарат: | «Лопастная мешалка»; |
| Объем среды растворения: | 900 мл; |
| Скорость вращения: | 100 об/мин; |
| Время растворения: | 45 мин. |

*Среда растворения.* Растворяют 8,4 г динатрия гидрофосфата безводного в 6 л воды и доводят рН раствора фосфорной кислотой до 6,80±0,05.

*Испытуемый раствор*. В каждый сосуд для растворения с предварительно нагретой средой растворения помещают одну таблетку. Через 45 мин отбирают пробу раствора и фильтруют, отбрасывая первые порции фильтрата. При необходимости полученный раствор дополнительно разводят средой растворения до ожидаемой концентрации изониазида от 66 до 84 мкг/мл.

***1. Изониазид, пиразинамид, рифампицин.*** Количество изониазида, пиразинамида и рифампицина, перешедшее в среду растворения, определяют методом ВЭЖХ в условиях испытания «Количественное определение. 1. Изониазид, пиразинамид, рифампицин» со следующими изменениями.

*Стандартный раствор.* Готовят раствор стандартных образцов изониазида, пиразинамида и рифампицина в растворителе с концентрациями, соответствующими ожидаемым концентрациям изониазида, пиразинамида и рифампицина в испытуемом растворе. Раствор используют в течение 10 мин.

Количество изониазида C6H7N3O, пиразинамида C5H5N3O и рифампицина C43Н58N4O12, перешедшее в раствор, в процентах от заявленного количества (*Х*) вычисляют по формуле:

$$X=\frac{S\_{1}∙C\_{0}∙900∙F∙P}{S\_{0}∙L},$$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *S*1 | **–** | площадь пика изониазида, пиразинамида или рифампицина на хроматограмме испытуемого раствора; |
|  | *S*0 | **–** | площадь пика изониазида, пиразинамида или рифампицина на хроматограмме стандартного раствора, соответственно; |
|  | *C*0 | **–** | концентрация стандартного образца изониазида, пиразинамида или рифампицина в стандартном растворе, соответственно, мг/мл; |
|  | *F* | **–** | фактор дополнительного разведения испытуемого раствора; |
|  | *P* | **–** | содержание изониазида, пиразинамида или рифампицина в стандартном образце изониазида, пиразинамида или рифампицина, соответственно, %; |
|  | *L* | **–** | заявленное количество изониазида, пиразинамида или рифампицина в одной таблетке, соответственно, мг. |

Через 45 мин в раствор должно перейти не менее 75 % (Q) изониазида C6H7N3O.

Через 45 мин в раствор должно перейти не менее 75 % (Q) пиразинамида C5H5N3O.

Через 45 мин в раствор должно перейти не менее 75 % (Q) рифампицина C43Н58N4O12.

***2. Этамбутола гидрохлорид.*** Количество этамбутола гидрохлорида, перешедшее в среду растворения, определяют методом ВЭЖХ в условиях испытания «Количественное определение. 2. Этамбутола гидрохлорид» со следующими изменениями.

*Раствор стандартного образца этамбутола гидрохлорида*. Готовят раствор стандартного образца этамбутола гидрохлорида в растворителе с концентрацией, соответствующей ожидаемой концентрации этамбутола гидрохлорида в испытуемом растворе.

Количество этамбутола гидрохлорида C10H24N2O2·2HCl, перешедшее в раствор, в процентах от заявленного количества (*Х*) вычисляют по формуле:

$$X=\frac{S\_{1}∙C\_{0}∙900∙F∙P}{S\_{0}∙L},$$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *S*1 | **–** | площадь пика этамбутола на хроматограмме испытуемого раствора; |
|  | *S*0 | **–** | площадь пика этамбутола на хроматограмме раствора стандартного образца этамбутола гидрохлорида; |
|  | *C*0 | **–** | концентрация стандартного образца этамбутола гидрохлорида в растворе стандартного образца этамбутола гидрохлорида, мг/мл; |
|  | *F* | **–** | фактор дополнительного разведения испытуемого раствора; |
|  | *P* | **–** | содержание этамбутола гидрохлорида в стандартном образце этамбутола гидрохлорида, %; |
|  | *L* | **–** | заявленное количество этамбутола гидрохлорида в одной таблетке, мг. |

Через 45 мин в раствор должно перейти не менее 75 % (Q) этамбутола гидрохлорида C10H24N2O2·2HCl.

**Родственные примеси**

***1. Примеси изониазида.*** Определение проводят методом ВЭЖХ (ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография»).

*Буферный раствор.* Растворяют 8,98 г калия дигидрофосфата и 0,1 г натрия дигидрофосфата безводного в 900 мл воды и доводят рН раствора фосфорной кислотой до 4,40±0,05. Переносят полученный раствор в мерную колбу вместимостью 1,0 л и доводят объём раствора водой до метки.

*Подвижная фаза (ПФ)*. Буферный раствор—ацетонитрил 500:500.

*Растворитель.* Вода—ацетонитрил 30:70.

*Раствор бензальдегида.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 1,0 г бензальдегида, растворяют в 90 мл смеси метанол—вода 90:10 и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

*Испытуемый раствор.* В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают точную навеску порошка растёртых таблеток, соответствующую около 35,7 мг изониазида, прибавляют 1 мл воды, 4 мл раствора бензальдегида, доводят объём раствора водой до метки, перемешивают и центрифугируют при 2500 об/мин в течение 20 мин. В мерную колбу вместимостью 5 мл помещают 2,0 мл полученного раствора и доводят объём раствора растворителем до метки.

*Раствор гидразина сульфата*. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают около 82 мг (точная навеска) гидразина сульфата, растворяют в воде и доводят объём раствора тем же растворителем до метки. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 1,0 мл полученного раствора и доводят объём раствора водой до метки. В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 1,0 мл полученного раствора, прибавляют 4 мл раствора бензальдегида, доводят объём раствора водой до метки и перемешивают в течение 20 мин. В мерную колбу вместимостью 5 мл помещают 2,0 мл полученного раствора и доводят объём раствора растворителем до метки.

*Хроматографические условия*

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Колонка |  | 125 × 4,0 мм, силикагель октадецилсилильный для хроматографии, 5 мкм; |
| Температура колонки |  | 25 °С; |
| Скорость потока |  | 1,0 мл/мин; |
| Детектор |  | спектрофотометрический, 310 нм; |
| Объём пробы |  | 50 мкл; |
| Время хроматографирования |  | 1,5-кратное от времени удерживания пика гидразина. |

Хроматографируют раствор гидразина сульфата и испытуемый раствор.

*Время удерживания соединений*. Гидразин – около 23 мин.

*Пригодность хроматографической системы.* На хроматограмме раствора гидразина сульфата:

- *фактор асимметрии* *пика (AS)* гидразина должен быть не более 2,0;

- *относительное стандартное отклонение* площади пика гидразина должно быть не более 2,0 % (6 определений);

- *эффективность хроматографической колонки (N)*, рассчитанная по пику гидразина, должна составлять не менее 10000 теоретических тарелок.

Содержание гидразина в препарате в процентах (*Х*) вычисляют по формуле:

$$Х=\frac{S\_{1}∙a\_{0}∙10∙1∙5∙1∙2∙P∙G∙32,04}{S\_{0}∙a\_{1}∙100∙2∙100∙10∙5∙L∙130,12}=\frac{S\_{1}∙a\_{0}∙P∙G∙32,04}{S\_{0}∙a\_{1}∙10000∙L∙130,12},$$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *S*1 | − | площадь пика гидразина на хроматограмме испытуемого раствора; |
|  | *S*0 | − | площадь пика гидразина на хроматограмме раствора гидразина сульфата; |
|  | *a*1 | − | навеска порошка растёртых таблеток, мг; |
|  | *a*0 | − | навеска гидразина сульфата, мг; |
|  | *P* | − | содержание основного вещества в гидразина сульфате, %; |
|  | *G* | − | средняя масса одной таблетки, мг; |
|  | *L* | − | заявленное количество изониазида в одной таблетке, мг; |
|  | *32,04* | – | молекулярная масса гидразина; |
|  | *130,12* | – | молекулярная масса гидразина сульфата. |

*Допустимое содержание примесей:*

- гидразин – не более 0,02 %.

***2. Примеси пиразинамида.*** Определение проводят методом ВЭЖХ (ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография»).

Все растворы используют свежеприготовленными.

*Раствор натрия дигидрофосфата*. В мерную колбу вместимостью 1,0 л помещают 0,78 г натрия дигидрофосфата безводного, растворяют в воде и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

*Подвижная фаза (ПФ)*. Ацетонитрил—раствор натрия дигидрофосфата 50:950.

*Растворитель.* Ацетонитрил—вода 5:95.

*Испытуемый раствор.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают точную навеску порошка растёртых таблеток, соответствующую около 50 мг пиразинамида, прибавляют 70 мл растворителя, обрабатывают ультразвуком в течение 20 мин, охлаждают до комнатной температуры, доводят объём раствора растворителем до метки, перемешивают и центрифугируют при 2500 об/мин в течение 5 мин.

*Раствор стандартного образца пиразинамида*. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают около 10 мг (точная навеска) стандартного образца пиразинамида, растворяют в растворителе и доводят объём раствора растворителем до метки. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 1,0 мл полученного раствора и доводят объём раствора растворителем до метки.

*Раствор стандартного образца изониазида*. В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 9,3 мг стандартного образца изониазида, растворяют в воде и доводят объём раствора тем же растворителем до метки. В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 1,0 мл полученного раствора и доводят объём раствора растворителем до метки.

*Раствор для проверки разделительной способности хроматографической системы.* В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 5 мг стандартного образца пиразинамида, растворяют в растворителе и доводят объём раствора растворителем до метки. В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 9,0 мл полученного раствора, прибавляют 1 мл хлористоводородной кислоты раствора 0,5 М, выдерживают на водяной бане при температуре 80 °С в течение 1 ч, охлаждают до комнатной температуры и доводят объём раствора растворителем до метки.

*Хроматографические условия*

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Колонка |  | 250 × 4,6 мм, силикагель октадецилсилильный, эндкепированный для хроматографии, 5 мкм; |
| Температура колонки: |  | 20 °С; |
| Скорость потока |  | 1,0 мл/мин; |
| Детектор |  | спектрофотометрический, 275 нм; |
| Объём пробы |  | 20 мкл; |
| Время хроматографирования |  | 15 мин. |

Хроматографируют раствор для проверки разделительной способности хроматографической системы, раствор стандартного образца изониазида, раствор стандартного образца пиразинамида и испытуемый раствор.

*Пригодность хроматографической системы*

На хроматограмме раствора для проверки разделительной способности хроматографической системы *разрешение* (*RS*) между пиком продукта деструкции с относительным временем удерживания около 0,5 и пиком пиразинамида должно быть не менее 4,0.

На хроматограмме раствора стандартного образца пиразинамида:

- *относительное стандартное отклонение* площади пика пиразинамида должно быть не более 2,0 % (6 определений);

- *эффективность хроматографической колонки (N)*, рассчитанная по пику пиразинамида, должна составлять не менее 7500 теоретических тарелок.

Содержание каждой из примесей в препарате в процентах (*Х*) вычисляют по формуле:

$$Х=\frac{S\_{1}∙a\_{0}∙100∙1∙P∙G}{S\_{0}∙a\_{1}∙100∙100∙L}=\frac{S\_{1}∙a\_{0}∙P∙G}{S\_{0}∙a\_{1}∙100∙L},$$

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

*Допустимое содержание примесей*

- любая примесь – не более 0,2 %;

- сумма примесей – не более 0,6 %.

Пик, соответствующий изониазиду, не учитывают.

***3. Примеси рифампицина.*** Определение проводят методом ВЭЖХ (ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография»).

*Раствор для приготовления подвижной фазы.* Растворяют 1,9 г натрия перхлората в 200 мл воды, прибавляют 1 мл фосфорной кислоты концентрированной, 5,9 г лимонной кислоты, 20,9 г калия дигидрофосфата, доводят водой до 1000 мл и перемешивают.

*Подвижная фаза (ПФ).* Ацетонитрил—раствор для приготовления подвижной фазы 35:65.

*Растворитель.* К 10 объемам 21,01 % раствора лимонной кислоты прибавляют 23 объема 13,61 % раствора калия дигидрофосфата, 77 объемов 17,42 % раствора дикалия гидрофосфата, 250 объемов ацетонитрила и 640 объемов воды.

*Испытуемый раствор.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают точную навеску порошка растёртых таблеток, соответствующую около 0,2 г рифампицина, прибавляют 30 мл ацетонитрила, обрабатывают ультразвуком в течение 20 мин, охлаждают до комнатной температуры, доводят объём раствора тем же растворителем до метки и фильтруют. В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 5,0 мл полученного раствора и доводят объём раствора растворителем до метки.

*Стандартный раствор*. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают около 10 мг (точная навеска) стандартного образца рифампицина, около 10 мг (точная навеска) стандартного образца рифампицина хинона, около 10 мг (точная навеска) стандартного образца рифампицина *N*-оксида, около 10 мг (точная навеска) стандартного образца 3-формил-рифамицина, растворяют в 70 мл ацетонитрила, обрабатывая ультразвуком, охлаждают до комнатной температуры и доводят объём раствора тем же растворителем до метки. В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 5,0 мл полученного раствора и доводят объём раствора растворителем до метки.

Примечание

Рифампицина хинон: ([(2*S*,12*Z*,14*E*,16*S*,17*S*,18*R*,19*R*,20*R*,21*S*,22*R*,23*S*,24*E*)-5,17,19-тригидрокси-2,4,12,16,18,20,22-гептаметил-8-[*N*-(4-метилпиперазин-1-ил)метанимидоил]-23-метокси-1,6,9,11-тетраоксо-1,2,6,9-тетрагидро-2,7-(эпоксипентадека[1,11,13]триеназано)нафто[2,1-*b*]фуран-21-ил]ацетат, CAS 13983-13-6.

Рифампицина *N*-оксид: [(2*S*,12*Z*,14*E*,16*S*,17*S*,18*R*,19*R*,20*R*,21*S*,22*R*,23*S*,24*E*)-5,6,9,17,19-пентагидрокси-2,4,12,16,18,20,22-гептаметил-8-[*N*-(4-метил-4-оксидопиперазин-4-ий-1-ил)метанимидоил]-23-метокси-1,11-диоксо-1,2-дигидро-2,7-(эпоксипентадека[1,11,13]триеназано)нафто[2,1-*b*]фуран-21-ил]ацетат, CAS 51963-55-4.

3-Формил-рифамицин: 1,2-дигидро-5,6,9,17,19,21-гексагидрокси-23-метокси-2,4,12,16,18,20,22-гептаметил-1,11-диоксо-2,7-(эпоксипентадека[1,11,13]триенимино)нафто[2,1-b]фуран-8-карбоксальдегид 21-ацетат, CAS 13292-22-3.

3-(Изоникотиноилгидразонметил)-рифамицин, CAS 13292-53-0.

*Хроматографические условия*

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Колонка |  | 100 × 4,6 мм, силикагель октилсилильный для хроматографии, 5 мкм; |
| Температура колонки: |  | 30 °С; |
| Температура образца:  |  | 10 °С; |
| Скорость потока |  | 1,5 мл/мин; |
| Детектор |  | спектрофотометрический, 254 нм; |
| Объём пробы |  | 50 мкл; |
| Время хроматографирования |  | 45 мин. |

Хроматографируют стандартный и испытуемый растворы.

*Относительное время удерживания соединений*. Рифампицин – 1; рифампицина хинон – около 0,59; рифампицина *N*-оксид – около 1,20; 3-(изоникотиноилгидразонметил)-рифамицин – около 1,51; 3-формил-рифамицин – около 2,97.

*Пригодность хроматографической системы*. На хроматограмме стандартного раствора:

- *разрешение* (*RS*) между пиками рифампицина хинона и рифампицина должно быть не менее 4,0;

- *разрешение* (*RS*) между пиками рифампицина и рифампицина *N*-оксида должно быть не менее 4,0;

- *фактор асимметрии* *пика* (*AS*) рифампицина должен быть не более 4,0;

- *относительное стандартное отклонение* площади пика рифампицина должно быть не более 2,0 % (6 определений);

- *эффективность хроматографической колонки (N)*, рассчитанная по пику рифампицина, должна составлять не менее 2000 теоретических тарелок.

*Поправочные коэффициенты*. Для расчёта содержания площадь пика 3-(изоникотиноилгидразонметил)-рифамицина умножается на поправочный коэффициент 0,82.

Содержание рифампицина хинона, рифампицина *N*-оксида и 3-формил-рифамицина в препарате в процентах (*Х*) вычисляют по формуле:

$$Х=\frac{S\_{1}∙a\_{0}∙100∙5∙50∙P∙G}{S\_{0}∙a\_{1}∙100∙5∙50∙L}=\frac{S\_{1}∙a\_{0}∙P∙G}{S\_{0}∙a\_{1}∙L},$$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *S*1 | − | площадь пика рифампицина хинона, рифампицина *N*-оксида или 3-формил-рифамицина на хроматограмме испытуемого раствора; |
|  | *S*0 | − | площадь пика рифампицина хинона, рифампицина *N*-оксида или 3-формил-рифамицина на хроматограмме стандартного раствора, соответственно; |
|  | *a*1 | − | навеска порошка растёртых таблеток, мг; |
|  | *a*0 | − | навеска стандартного образца рифампицина хинона, рифампицина *N*-оксида или 3-формил-рифамицина, соответственно, мг; |
|  | *P* | − | содержание рифампицина хинона, рифампицина *N*-оксида или 3-формил-рифамицина в стандартном образце рифампицина хинона, рифампицина *N*-оксида или 3-формил-рифамицина, соответственно, %; |
|  | *G* | − | средняя масса одной таблетки, мг; |
|  | *L* | − | заявленное количество рифампицина в одной таблетке, мг. |

Содержание 3-(изоникотиноилгидразонметил)-рифамицина и любой другой примеси в препарате в процентах (*Х*) вычисляют по формуле:

$$Х=\frac{S\_{1}∙a\_{0}∙5∙100∙50∙P∙G}{S\_{0}∙a\_{1}∙5∙100∙50∙L}=\frac{S\_{1}∙a\_{0}∙P∙G}{S\_{0}∙a\_{1}∙L},$$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *S*1 | − | площадь пика 3-(изоникотиноилгидразонметил)-рифамицина или любой другой примеси на хроматограмме испытуемого раствора; |
|  | *S*0 | − | площадь пика рифампицина на хроматограмме стандартного раствора; |
|  | *a*1 | − | навеска порошка растёртых таблеток, мг; |
|  | *a*0 | − | навеска стандартного образца рифампицина, мг; |
|  | *P* | − | содержание рифампицина в стандартном образце рифампицина, %; |
|  | *G* | − | средняя масса одной таблетки, мг; |
|  | *L* | − | заявленное количество рифампицина в одной таблетке, мг. |

*Допустимое содержание примесей:*

- 3-(изоникотиноилгидразонметил)-рифамицин – не более 5,0 %;

- рифампицина хинон – не более 3,0 %;

- рифампицина *N*-оксид – не более 1,5 %;

- 3-формил-рифамицина – не более 1,5 %;

- любая другая примесь – не более 1,5 %.

***4. Примеси этамбутола гидрохлорида.*** Определение проводят методом ТСХ (ОФС «Тонкослойная хроматография»).

*Пластинка.* ТСХ пластинка со слоем силикагеля.

*Подвижная фаза (ПФ).* Аммиака раствор концентрированный 25 %—вода—метанол 10:15:75.

*Испытуемый раствор.* Навеску порошка растёртых таблеток, соответствующую 0,50 г этамбутола гидрохлорида, помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, прибавляют 7 мл метанола, встряхивают в течение 5 мин, доводят объём раствора метанолом до метки, перемешивают и фильтруют.

*Раствор аминобутанола.* В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 50 мг аминобутанола (примесь А), растворяют в метаноле и доводят объём раствора тем же растворителем до метки. В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 1,0 мл полученного раствора и доводят объём раствора метанолом до метки.

*Раствор для проверки пригодности хроматографической системы.* В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 50 мг стандартного образца этамбутола гидрохлорида, 5 мг аминобутанола, растворяют в метаноле и доводят объём раствора метанолом до метки.

На линию старта пластинки наносят по 2 мкл испытуемого раствора (100 мкг), раствора аминобутанола (1 мкг) и раствора для проверки пригодности хроматографической системы. Пластинку с нанесенными пробами высушивают на воздухе в течение 5 мин, помещают в камеру с ПФ и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт ПФ пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей и выдерживают в сушильном шкафу при температуре 110 °С в течение 10 мин. После охлаждения до комнатной температуры пластинку опрыскивают нингидрина спиртовым раствором, повторно выдерживают в сушильном шкафу при температуре 110 °С в течение 5 мин и просматривают при дневном свете.

Хроматографическая система считается пригодной, если на хроматограмме раствора для проверки пригодности хроматографической системы чётко видны две зоны адсорбции.

На хроматограмме испытуемого раствора зона адсорбции, находящаяся на уровне зоны адсорбции аминобутанола, по совокупности величины и интенсивности окраски не должна превышать зону адсорбции на хроматограмме раствора аминобутанола (не более 1,0 %).

Однородность дозирования. В соответствии с ОФС «Однородность дозирования».

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

**Количественное определение**

***1. Изониазид, пиразинамид, рифампицин.*** Определение проводят методом ВЭЖХ (ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография»).

*Буферный раствор.* Растворяют 1,4 г динатрия гидрофосфата безводного в 800 мл воды, перемешивают и доводят рН раствора фосфорной кислотой до 6,80±0,05. Переносят полученный раствор в мерную колбу вместимостью 1 л и доводят объём раствора водой до метки.

*Подвижная фаза А (ПФА).* Ацетонитрил—буферный раствор 40:960.

*Подвижная фаза Б (ПФБ).* Буферный раствор—ацетонитрил 450:550.

*Растворитель.* Метанол—буферный раствор 4:96.

*Испытуемый раствор*. Точную навеску порошка растёртых таблеток, соответствующую около 8 мг изониазида, помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 90 мл растворителя, обрабатывают ультразвуком в течение 10 мин, охлаждают до комнатной температуры, доводят объём раствора растворителем до метки, перемешивают и фильтруют. Раствор используют в течение 2 ч.

*Стандартный раствор*. Готовят раствор стандартных образцов изониазида, пиразинамида и рифампицина в растворителе с концентрациями, соответствующими ожидаемым концентрациям изониазида, пиразинамида и рифампицина в испытуемом растворе. Раствор используют в течение 10 мин.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 250 × 4,6 мм, силикагель октадецилсилильный, деактивированный по отношению к основаниям, эндкепированный для хроматографии, 5 мкм; |
| Температура колонки | 25 °С; |
| Скорость потока | 1,5 мл/мин; |
| Детектор | спектрофотометрический, 238 нм; |
| Объём пробы | 20 мкл. |

*Режим хроматографирования*

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Время, мин | ПФА, % | ПФБ, % |
| 0–5 | 100 | 0 |
| 5–6 | 100 → 0 | 0 → 100 |
| 6–15 | 0 | 100 |

Хроматографируют стандартный и испытуемый растворы.

*Относительное время удерживания соединений*. Пиразинамид – 1 (около 5 мин); изониазид – около 0,7, рифампицин – около 1,8.

*Пригодность хроматографической системы*. На хроматограмме стандартного раствора:

- *разрешение* (*RS*) между пиками изониазида и пиразинамида должно быть не менее 4,0;

- *фактор асимметрии каждого из пиков (AS)* изониазида, пиразинамида и рифампицина должен быть не более 2,0;

*- относительное стандартное отклонение* площади каждого из пиков изониазида, пиразинамида и рифампицина должно быть не более 2,0 % (6 определений);

- *эффективность хроматографической колонки (N)*, рассчитанная по пику рифампицина, должна составлять не менее 50000 теоретических тарелок;

- *эффективность хроматографической колонки (N)*, рассчитанная по пику изониазида, должна составлять не менее 6000 теоретических тарелок;

- *эффективность хроматографической колонки (N)*, рассчитанная по пику пиразинамида, должна составлять не менее 10000 теоретических тарелок.

Содержание изониазида C6H7N3O, пиразинамида C5H5N3O или рифампицина C43Н58N4O12 в препарате в процентах от заявленного количества (*Х*) вычисляют по формуле:

$$X=\frac{S\_{1}∙C\_{0}∙100∙P∙G}{S\_{0}∙a\_{1}∙L},$$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *S*1 | **–** | площадь пика изониазида, пиразинамида или рифампицина на хроматограмме испытуемого раствора; |
|  | *S*0 | **–** | площадь пика изониазида, пиразинамида или рифампицина на хроматограмме стандартного раствора, соответственно; |
|  | *a*1 | **–** | навеска порошка растёртых таблеток, мг; |
|  | *C*0 | **–** | концентрация стандартного образца изониазида, пиразинамида или рифампицина в стандартном растворе, мг/мл; |
|  | *P* | **–** | содержание изониазида, пиразинамида или рифампицина в стандартном образце изониазида, пиразинамида или рифампицина, соответственно, %; |
|  | *G* | **–** | средняя масса одной таблетки, мг; |
|  | *L* | **–** | заявленное количество изониазида, пиразинамида или рифампицина в одной таблетке, соответственно, мг. |

***2. Этамбутола гидрохлорид.*** Определение проводят методом ВЭЖХ (ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография»).

*Буферный раствор.* Растворяют 1,0 мл триэтиламина в 1 л воды и доводят рН раствора фосфорной кислотой до 7,00±0,05.

*Подвижная фаза (ПФ).* Буферный раствор—ацетонитрил 500:500.

*Растворитель.* Растворяют 1,4 г динатрия гидрофосфата безводного в 800 мл воды, перемешивают и доводят рН раствора фосфорной кислотой до 6,80±0,05. Переносят полученный раствор в мерную колбу вместимостью 1 л и доводят объём раствора водой до метки.

*Испытуемый раствор*. Точную навеску порошка растёртых таблеток, соответствующую около 30 мг этамбутола гидрохлорида, помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 90 мл растворителя, обрабатывают ультразвуком в течение 10 мин, охлаждают до комнатной температуры, доводят объём раствора растворителем до метки, перемешивают и фильтруют.

*Раствор стандартного образца этамбутола гидрохлорида*. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают около 30 мг (точная навеска) стандартного образца этамбутола гидрохлорида, растворяют в растворителе, обрабатывая ультразвуком, охлаждают до комнатной температуры и доводят объём раствора растворителем до метки.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 150 × 4,6 мм, силикагель нитрильный для хроматографии, 5 мкм; |
| Температура колонки | 25 °С; |
| Скорость потока | 1,0 мл/мин; |
| Детектор | спектрофотометрический, 200 нм; |
| Объём пробы | 100 мкл. |

Хроматографируют раствор стандартного образца этамбутола гидрохлорида и испытуемый раствор.

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

- *фактор асимметрии* *пика (AS)* этамбутола должен быть не более 3,0;

*- относительное стандартное отклонение* площади пика этамбутола должно быть не более 2,0 % (6 определений);

- *эффективность хроматографической колонки (N)*, рассчитанная по пику этамбутола, должна составлять не менее 5000 теоретических тарелок.

Содержание этамбутола гидрохлорида C10H24N2O2·2HCl в препарате в процентах от заявленного количества (*Х*) вычисляют по формуле:

$$X=\frac{S\_{1}∙a\_{0}∙100∙P∙G}{S\_{0}∙a\_{1}∙100∙L}=\frac{S\_{1}∙a\_{0}∙P∙G}{S\_{0}∙a\_{1}∙L},$$

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

**Хранение.** В защищённом от света месте.