**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

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

**Пиридоксина гидрохлорид + ФС**

**Тиамина гидрохлорид,**

**раствор для внутривенного**

**и внутримышечного введения**

***Pyridoxini hydrochloridi +***

***Thiamini hydrochloridi,***

***solutio intravenous***

***et intramuscular iniectio*  Вводится впервые**

 Настоящая фармакопейная статья распространяется на поливитаминный лекарственный препарат Пиридоксина гидрохлорид + Тиамина гидрохлорид, раствор для внутривенного и внутримышечного введения.

 Препарат содержит от заявленного количества не менее 95 % и не более 105 % Пиридоксина гидрохлорида и не менее 95 % и не более 110 % Тиамина гидрохлорида. Препарат должен соответствовать приведенным ниже требованиям.

 **Описание.** Прозрачный раствор с лёгким желтовато-зеленым оттенком.

 **Подлинность**

 Время удерживания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора, приготовленного для количественного определения, должно соответствовать времени удерживания основного пика на хроматограмме стандартного раствора пиридоксина гидрохлорида. Определение проводят по разделу «Количественное определение» (пиридоксина гидрохлорид).

Время удерживания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора должно соответствовать времени удерживания основного пика на хроматограмме стандартного раствора тиамина гидрохлорида. Определение проводят по разделу «Количественное определение»(тиамина гидрохлорид).

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

 **Цветность.** Должен выдерживать сравнение с эталоном GY6.

Определение проводят в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей».

**рН.** От 2,3 до 2,8. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

 **Плотность.** От 1,040 до 1,050 г/см3. Определение проводят в соответствии с ОФС «Плотность» метод 1.

 **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****.*

Количество частиц размером:

более 10 мкм - не должно превышать 6000 частиц на ампулу;

более 25 мкм — не должно превышать 600 частиц на ампулу.

Определение проводят в соответствиис ОФС «Невидимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения».

 **Родственные примеси**

**Пиридоксина гидрохлорид**

Стандартный образец примесь В пиридоксина 4-деоксипиридоксина гидрохлорид (5-(гидрокси-4,6-диметил-3- пиридинметанола-гидрохлорид)

Примесь В

 *Подвижная фаза (ПФ).* 2,72 г калия фосфата однозамещенного растворяют в 1000 мл воды, доводят pH раствора до 2,1 ± 0,05 фосфорной кислотой 10 % и перемешивают.

\* Так как ПФ не содержит органической составляющей, колонку следует регенерировать после 8 ч работы. Для этой цели колонку промывают смесью ацетонитрил - вода, последовательно увеличивая содержание ацетонитрила до 80 % (об). Колонку хранят заполненной смесью ацетонитрил - вода 80:20 (об/об).

 *Приготовление фосфорной кислоты раствора 10 %.* К 115 г фосфорной кислоты концентрированной добавляют 885 г воды и перемешивают.

*Испытуемый раствор*. 1 мл препарата помещают в мерную колбу вместимостью 200 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.  *Стандартный раствор*. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают около 25 мг (точная навеска) СО пиридоксина гидрохлорида, растворяют в воде, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

1,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

*Раствор для контроля разрешения*. Около 2,5 мг (точная навеска) стандартного образца примеси А пиридоксина и около 2,5 мг (точная навеска) СО примеси В пиридоксина помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, растворяют в воде, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

*Раствор для определения чувствительности*. 5 мл стандартного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Все испытуемые, стандартные растворы используют свежеприготовленными. *Хроматографические условия*

Колонка: 250 х 3 мм силикагель октадецилсилильный (Cl8) 5 мкм, с предколонкой 4 х 2 мм 5 мкм (Cl8);

Температура колонки: 30 °С;

 Скорость потока ПФ: 0,4 мл/мин;

Детектирование: УФ 210 нм (диодный матричный детектор);

Вводимый объем: 5 мкл;

Диапазон регистрации УФ-спектров пиридоксина и его примесей от 190 до 450 нм.

*Проверка пригодности хроматографической системы.*

После подготовки и уравновешивания хроматографической системы не менее 5 раз хроматографируют стандартный раствор.

Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

*На хроматограмме стандартного раствора:*

* относительное стандартное отклонение для площади пика пиридоксина не более 2%;
* фактор асимметрии пика пиридоксина *(As)* не более 2,0;
* эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику пиридоксина не менее 5000 теоретических тарелок;

*На хроматограмме раствора для контроля разрешения:*

* разрешение между пиками примеси А пиридоксина и примеси В пиридоксина не менее 1,6.

- относительное время удерживания примеси А пиридоксина относительно пика пиридоксина около 1,5.

 На хроматограмме раствора для определения чувствительности отношение сигнал /шум для пика пиридоксина гидрохлорида должно быть не менее 10.

Хроматографируют испытуемый раствор, регистрируют хроматограмму, диодным матричным детектором. Регистрируют УФ спектры пиков примесей и вычисляют площади пиков примесей.

Хроматографируют стандартный раствор, регистрируют хроматограмму, диодным матричным детектором. Регистрируют УФ спектр пика пиридоксина и вычисляют площадь пика пиридоксина.

 Пик примеси В пиридоксина на хроматограмме испытуемого раствора идентифицируют по относительному времени удерживания (1,6 относительно времени удерживания пиридоксина), или по хроматограмме раствора для контроля разрешения (порядок выхода пик примеси А пиридоксина, пик примеси В пиридоксина).

 Площадь пика примеси В пиридоксина на хроматограмме испытуемого раствора должна быть не более 1,5 площади пика пиридоксина на хроматограмме стандартного раствора (не более 0,15 %).

 Площадь пика любой другой единичной примеси на хроматограмме испытуемого раствора должна быть не более 5-кратной площади пика пиридоксина на хроматограмме стандартного раствора (не более 0,5 %). Суммарная площадь пиков неидентифицированных примесей на хроматограмме испытуемого раствора должна не более чем в 10 раз превышать площадь пика пиридоксина на хроматограмме стандартного раствора (не более 1,0 %).

При контроле содержания примесей не учитывают пики, площадь которых менее 0,5 площади пика пиридоксина на хроматограмме стандартного раствора (0,05 %).

 ***Тиамина гидрохлорид***

- Любая единичная неидентифицированной примесь — не более 0,5 %.

- Сумма неидентифицированных примесей — не более 1 %.

Определение проводят методом ВЭЖХ.

*Буферный раствор*. В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 3,764 г натриевой соли гексансульфоновой кислоты и 3,12 г натрия фосфата однозамещенного, растворяют в воде, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают и далее доводят pH раствора до pH 3,1 ± 0,05 фосфорной кислотой 10 %.

*Приготовление раствора фосфорной кислоты 10 %*. К 115 г фосфорной кислоты концентрированной добавляют 885 г воды и перемешивают.

*Подвижная фаза А (ПФА).* Смешивают 10 объемов метанола и 90 объемов буферного раствора и доводят pH раствора до 3,5 ± 0,05 натрия гидроксида раствором 10 %.

*Подвижная фаза В (ПФВ).* Смешивают 50 объемов метанола и 50 объемов буферного раствора и доводят pH раствора до 3,5 ±0,05 натрия гидроксида раствором 10 %.

*Испытуемый раствор*. 1 мл препарата помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

*Раствор сравнения*. 1 мл испытуемого раствора помещают в мерную колбу вместимостью 200 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

*Раствор для контроля разрешения*. 1 мг СО тиамина гидрохлорида и 1 мг СО примеси Е тиамина помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 2 мл уксусной кислоты раствора 5 %, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

*Приготовление уксусной кислоты раствора 5 %.* 5,1 г ледяной уксусной кислоты доводят водой до объема 100 мл и перемешивают.

*Раствор для определения чувствительности*. 5 мл стандартного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Все испытуемые, стандартные растворы используют свежеприготовленными.

*Хроматографические условия:*

Колонка: 250 х 3 мм силикагель октадецилсилильный деактивированный по отношению к основаниям для хроматографии (С18), 5 мкм, с предколонкой 1 см (С18), 5 мкм.

Температура колонки: 25° С;

Градиентная программа:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  Время, мин  |  ПФА, % |  ПФВ, % |
| 0 | 100 |  0 |
|  25 |  50 |  50 |
|  33  |  0 |  100  |
|  40 |  0 |  100 |
|  45 |  100 |  0 |
|  50 |  Стоп  |  |

Скорость потока: 0,7 мл/мин;

Детектирование: УФ 248 нм (матричный диодный детектор);

Вводимый объем пробы: 10 мкл;

Диапазон регистрации УФ спектров тиамина и его примесей от 190 до 450 нм.

*Проверка пригодности хроматографической стстемы*

 После подготовки и уравновешивания хроматографической системы не менее 5 раз хроматографируют раствор сравнения.

Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

На хроматограмме раствора сравнения:

* относительное стандартное отклонение для площади пика тиамина не более 2 %;
* фактор асимметрии пика тиамина *(As)* не более 2,0;
* эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику тиамина не менее 10000 теоретических тарелок;

На хроматограмме раствора для контроля разрешения:

- разрешение между пиками тиамина и примеси Е тиамина не менее 1,6.

На хроматограмме раствора для определения чувствительности отношение сигнал /шум для пика тиамина должно быть не менее 10.

 Хроматографируют испытуемый раствор, регистрируют хроматограмму, диодным матричным детектором регистрируют УФ спектры пиков примесей и вычисляют площади пиков примесей.

 Хроматографируют раствор сравнения, регистрируют хроматограмму, диодным матричным детектором регистрируют УФ спектр пика тиамина и вычисляют площадь пика тиамина.

 Пики, УФ спектры которых аналогичны УФ спектру пика тиамина, относят к примесям тиамина гидрохлорида. Площадь пика любой примеси на хроматограмме испытуемого раствора должна быть не более площади пика тиамина на хроматограмме раствора сравнения (не более 0,5 %). Суммарная площадь пиков примесей на хроматограмме испытуемого раствора должна быть не более чем в 2 раза превышать площадь пика тиамина на хроматограмме раствора сравнения (не более 1,0 %).

 При контроле содержания примесей не учитывают пики, площадь которых менее 0,1 площади пика тиамина на хроматограмме раствора сравнения (0,05 %).

 **Извлекаемый объем.** Не менее номинального**.** Определение проводят в соответствии с ОФС ««Извлекаемый объем лекарственных форм для парентерального применения».

**Бактериальные эндотоксины.** Не более 20,0 ЕЭ/мл. Определение проводят согласно требованиям ОФС «Бактериальные эндотоксины».

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

 **Количественное определение**

Определение проводят методом ВЭЖХ.

*Приготовление испытуемого раствора.*1 мл препарата переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл затем доводят объем раствора до метки водой и перемешивают (испытуемый раствор 1).

Далее 5 мл (испытуемого раствора 1) переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора до метки водой и перемешивают (испытуемый раствор 2).

*Приготовление стандартных растворов.*

 В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают около 50 мг (точная навеска) СО тиамина гидрохлорида и около 25 мг (точная навеска) СО пиридоксина гидрохлорида, растворяют в воде, доводят объем раствора до метки водой и перемешивают (стандартный раствор 1).

 5 мл полученного стандартного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора до метки водой и перемешивают (стандартный раствор 2).

Концентрация разведенного раствора тиамина гидрохлорида — 0,05 мг/мл.

Концентрация разведенного раствора пиридоксина гидрохлорида — 0,025 мг/мл.

\*Стандартные растворы готовят в двух повторностях.

*Условия хроматографирования*

 Колонка: 250 х 4,6 мм (С18), силикагель эндкепированный для хроматографии 5 мкм, соответствующая требованиям хроматографической системы;

Подвижная фаза: к 2000 мл воды прибавляют 6,6 мл 85 % ортофосфорной

кислоты и 6,6 мл триэтиламина, перемешивают, доводят значение pH раствора до 2,8 6 М раствором натрия гидроксида и вновь перемешивают. Далее раствор фильтруют через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм и дегазируют.

Температура колонки: 25°С

Скорость потока: 1мл/мин

Детектор: УФ, 280 нм

Объем вводимой пробы: 20 мкл

*Оценка пригодности хроматографической системы*

Вводят в хроматограф подвижную фазу и отмечают отсутствие пиков, мешающих определению тиамина гидрохлорида и пиридоксина гидрохлорида. Подвижную фазу хроматографируют в конце анализа. Хроматографируют стандартный раствор тиамина гидрохлорида и пиридоксина гидрохлорида не менее 3 раз.

 - Относительное стандартное отклонение площадей пиков тиамина и пиридоксина не должно превышать 1,5 %;

- Коэффициент разделения между пиками тиамина и пиридоксина должен быть не менее 2;

- Коэффициент ассиметрии пика *(As)* тиамина гидрохлорида для всех определяемых веществ - не более 1,0.

- Эффективность хроматографической колонки по обоим пикам - не менее 1500 теоретических тарелок;

 Хроматографируют последовательно не менее 3 проб стандартного раствора. Время удерживания пика тиамина гидрохлорида составляет около 2,8 мин, а пика пиридоксина гидрохлорида — около 5,6 мин.

Хроматографируют растворы в следующее последовательности: подвижная фаза (1 раз), растворитель (1 раз), стандартный раствор 1(2 раза), стандартный раствор 2 (2 раза), испытуемый раствор (2 раза), испытуемый раствор 2 (2 раза).

Содержание тиамина гидрохлорида (ТГХ) в процентах вычисляют по формуле:

 $ТХГ=\frac{Atest∙Wstd∙5∙100∙100∙P}{Ast∙50∙100∙1∙5∙C},$

 где: Atest -площадь пика тиамина на хроматограмме испытуемого раствора; Wstd — навеска СО тиамина гидрохлорида, мг;

 Р - содержание тиамина гидрохлорида в СО, %;

 Astd - площадь пика тиамина гидрохлорида на хроматограмме стандартного раствора;

 С - заявленное количество тиамина (100 мг/мл).

Содержание пиридоксина гидрохлорида (ПГ) в процентах в препарате вычисляют по формуле:

 ПГ $=\frac{Atest∙Wstd∙5∙100∙100∙P}{Ast∙50∙100∙1∙5∙C},$

где: Atest — площадь пика пиридоксина гидрохлорида на хроматогрмамме испытуемого раствора;

 Wstd — навеска СО пиридоксина гидрохлорида, мг;

 Р - содержание пиридоксина гидрохлорида в стандартном образце, %;

 Astd — площадь пика пиридоксина гидрохлорида на хроматограмме стандартного раствора;

 С — заявленное количество пиридоксина гидрохлорида, (50 мг/мл).

 **Хранение.** В защищенном от света месте при температуре не выше 25 ºС в соответствии с ОФС «Хранение лекарственных средств».