**Амикацина сульфат ФС**

**Амикацин**

**Amikacini sulfas Взамен ВФС 42-1879-89**

1-*N*-[(2*S*)-4-Амино-2-гидроксибутаноил]-6-*O*-(3-амино-3-дезокси-α-D-глюкопиранозил)-4-*O*-(6-амино-6-дезокси-α-D-глюкопиранозил)-2-дезокси-D-стрептамина сульфат (1:2)



|  |  |
| --- | --- |
| C22H43N5O13·2H2SO4 | М. м. 781,8 |

Cодержит не менее 96,5 % и не более 102,0 % амикацина сульфата C22H43N5O13·2H2SO4 в пересчёте на сухое вещество.

**Описание.** Белый или почти белый порошок.

**Растворимость**. Легко растворим в воде, практически нерастворим в спирте 96 % и ацетоне.

**Подлинность**

*1.**ИК-спектрометрия* (ОФС «Спектрометрия в инфракрасной области»)*.* 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 амикацина сульфата.

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

*3. Качественная реакция.* Раствор 10 мг субстанции в 5 мл воды должен давать реакцию на сульфаты (ОФС «Общие реакции на подлинность»).

*4.* *Тонкослойная хроматография* (ОФС «Тонкослойная хроматография»).

*Пластинка.* ТСХ пластинка со слоем силикагеля.

*Подвижная фаза (ПФ).* Метиленхлорид—аммиака раствор—метанол 25:30:40.

*Испытуемый раствор.* В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 25 мг субстанции, растворяют в воде и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

*Раствор стандартного образца амикацина сульфата.* В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 25 мг стандартного образца амикацина сульфата, растворяют в воде и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

*Раствор для проверки разделительной способности хроматографической системы.* В мерную колбу вместимостью 1 мл помещают5 мгстандартного образца канамицина моносульфата, растворяют в 1 мл испытуемого раствора. Полученный раствор переносят в мерную колбу вместимостью 10 мл и доводят объём раствора водой до метки.

На линию старта пластинки наносят по 5 мкл испытуемого раствора (12,5 мкг), раствора стандартного образца амикацина сульфата (12,5 мкг), раствора для проверки разделительной способности хроматографической системы (2,5 мкг). Пластинку с нанесёнными пробами высушивают на воздухе в течение 5 мин, помещают в насыщенную камеру с ПФ и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт ПФ пройдет около 80–90 % длины пластинки от линии старта, её вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей и опрыскивают нингидрина спиртовым раствором.

Хроматографическая система считается пригодной, если:

- на хроматограмме раствора для проверки разделительной способности хроматографической системы чётко видны две зоны адсорбции.

Основная зона адсорбции на хроматограмме испытуемого раствора, по положению, интенсивности поглощения и величине должна соответствовать основной зоне адсорбции на хроматограмме раствора стандартного образца амикацина сульфата.

**Удельное вращение.** От +76 до +84 в пересчёте на сухое вещество (2 % раствор субстанции в воде ОФС «Поляриметрия»).

 Прозрачность раствора. Раствор 2,0 г субстанции в 5 мл воды должен быть прозрачным (ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей»).

 **Цветность раствора.** Раствор, полученный в испытании «Прозрачность раствора», должен выдерживать сравнение с эталоном Y4 или BY4 (ОФС «Степень окраски жидкостей», метод 2).

рН. От 2,0 до 4,0 (1 % раствор в воде, свободной от углерода диоксида, ОФС «Ионометрия», метод 3).

Родственные примеси. Определение проводят методом ВЭЖХ (ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография»).

*Подвижная фаза А (ПФА).* В мерную колбу вместимостью 1 л помещают 1,8 г натрия октансульфоната, 20,0 г натрия сульфата безводного, растворяют в воде, свободной от углерода диоксида, прибавляют 14 мл тетрагидрофурана водного раствора 1,4 % (о/о) и 50 мл калия дигидрофосфата раствора 0,2 М, предварительно доведённого фосфорной кислоты раствором 2 М до рН 3,0.

*Подвижная фаза Б (ПФБ).* В мерную колбу вместимостью 1 л помещают 1,8 г октансульфоната натрия, 28,0 г натрия сульфата безводного, растворяют в воде, свободной от углерода диоксида, прибавляют 14 мл тетрагидрофурана водного раствора 1,4 % (о/о) и 50 мл калия дигидрофосфата раствора 0,2 М, предварительно доведенного фосфорной кислоты раствором 2 М до рН 3,0.

*Испытуемый раствор.* В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 33 мг субстанции, растворяют в ПФА и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

*Раствор стандартного образца примеси I.* В мерную колбу вместимостью 20 мл помещают 6,6 мг стандартного образца примеси I*,* растворяют в ПФА 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 ПФА до метки.

*Раствор сравнения.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 1,0 мл испытуемого раствора и доводят объём раствора ПФА до метки.

*Раствор для проверки пригодности хроматографической системы.* В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 5,0 мг стандартного образца амикацина для проверки пригодности хроматографической системы, содержащего примеси А, В, F, Н, растворяют в ПФА и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

*Раствор для проверки чувствительности хроматографической системы.* В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 1,0 мл раствора сравнения и доводят объём раствора ПФА до метки.

*Постколоночный раствор.* Насыщенный раствор натрия гидроксида—вода, свободная от углерода диоксида 1:24, который подают непрерывно после колонки с использованием полимерного смесителя вместимостью 375 мкл. Скорость потока раствора 0,3 мл/мин.

Примечание.

 Примесь A: 1-*N*-[(2*S*)-4-Амино-2-гидроксибутаноил]-4-*O*-(3-амино-3-дезокси-α-D-глюкопиранозил)-6-*O*-(6-амино-6-дезокси-α-D-глюкопиранозил)-2-дезокси-L-стрептамин, CAS 50725-24-1;

 Примесь В : 1,3-*N*-Бис[(2*S*)-4-амино-2-гидроксибутаноил]-6-*O*-(3-амино-3-дезокси-α-D-глюкопиранозил)-4-*O*-(6-амино-6-дезокси-α-D-глюкопиранозил)-2-дезокси-D-стрептамин, CAS 927821-99-6;

 Примесь F: 4-*O*-{6-[(2*S*)-4-Амино-2-гидроксибутанамидо]-6-дезокси-α-D-глюкопиранозил}-1-*N*-[(2*S*)-4-амино-2-гидроксибутаноил]-6-*O*-(3-амино-3-дезокси-α-D-глюкопиранозил)-2-дезокси-D-стрептамин, CAS 197909-67-4;

 Примесь Н: 1-*N*-[(2*S*)-4-Амино-2-гидроксибутаноил]-6-*O*-(3-амино-3-дезокси-α-D-глюкопиранозил)-4-*O*-(2,6-диамино-2,6-дидезокси-α-D-глюкопиранозил)-2-дезокси-D-стрептамин, CAS 48237-20-3;

 Примесь I: (2*S*)-4-Амино-2-гидроксибутановая кислота, CAS 40371-51-5.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 250 × 4,6 мм, **силикагель октадецилсилильный, эндкепированный для хроматографии** (С18), 5 мкм; |
| Температура колонки | 40 °С; |
| Скорость потока | 1,0 мл/мин; |
| Детектор | импульсный амперометрический; |
| Объём пробы | 20 мкл; |
| Время хроматографирования | 2-кратное от времени удерживания пика амикацина. |

*Режим хроматографирования*

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Время, мин | ПФА, % | ПФБ, % |
| 0–3 | 100 | 0 |
| 3–38,0 | 100→30 | 0→70 |
| 38,0–38,1 | 30→0 | 70→100 |
| 38,1–68 | 0 | 100 |
| 68–70 | 0→100 | 100→0 |

Последовательно хроматографируют раствор для проверки чувствительности хроматографической системы, раствор для проверки пригодности хроматографической системы, раствор стандартного образца примесиI, раствор сравнения, испытуемый раствор.

*Относительное время удерживания соединений.* Амикацин – 1 (около 28 мин); примесь I– около 0,13; примесь F – около 0,92; примесь В – около 0,95; примесь А – около 1,62; примесь Н – около 1,95.

 *Идентификация примесей.* Для идентификации пиков примесей А, В, F, Н используется хроматограмма раствора для проверки пригодности хроматографической системы; для идентификации пика примеси I используется хроматограмма раствора стандартного образца примеси I.

*Пригодность хроматографической системы*. На хроматограмме раствора для проверки пригодности хроматографической системы *разрешение* (*R*S) между пиками примеси В и амикацина должно быть не менее 5,0.

 Содержание каждой из примесей в субстанции в процентах вычисляют согласно методу нормирования.

*Допустимое содержание примесей.* На хроматограмме испытуемого раствора:

 - примеси А, В, F, Н,  I– не более 0,5 % каждая;

 - любая другая примесь – не более 0,5 %;

 - сумма примесей – не более 1,5 %.

**Потеря в массе при высушивании.** Не более 13,0 % (ОФС «Определение воды», метод 1). Для определения используют около 0,5 г (точная навеска) субстанции.

**Сульфатная зола.** Не более 1,0 % (ОФС «Сульфатная зола»). Для определения используют около 1,0 г (точная навеска) субстанции.

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

**Аномальная токсичность.** Субстанция должна быть нетоксичной (ОФС «Аномальная токсичность»). Тест-доза – 1,0 мг амикацина в 0,5 мл натрия хлорида раствора 0,9 % на мышь.

 **Бактериальные эндотоксины.** Не более 0,33 ЕЭ на 1 мг амикацина (ОФС «Бактериальные эндотоксины»).

 **Стерильность.** Субстанция должна быть стерильной (ОФС «Стерильность»).

**Количественное определение.**

***Амикацин.*** Определение проводят методом ВЭЖХ (ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография»).

*Подвижная фаза (ПФ).* В мерную колбу вместимостью 1 л помещают 1,8 г натрия октансульфоната, 20 г натрия сульфата безводного, растворяют в воде, свободной от углерода диоксида, прибавляют 58 мл ацетонитрила и 50 мл калия дигидрофосфата раствора 0,2 М, предварительно доведённого фосфорной кислоты раствором 2 М до рН 3,0.

*Испытуемый раствор.* В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают около 50 мг (точная навеска) субстанции, растворяют в ПФ и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

*Раствор стандартного образца амикацина.* В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают около 37,4 мг (точная навеска) стандартного образца амикацина, растворяют в ПФ и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 250 × 4,6 мм, **силикагель октадецилсилильный эндкепированный для хроматографии** (С18), 5 мкм; |
| Температура колонки | 40 °С; |
| Скорость потока | 1,0 мл/мин; |
| Детектор | спектрофотометрический, 200 нм; |
| Объём пробы | 20 мкл. |

Время удерживанияамикацина – около 30 мин.

Хроматографируют испытуемый раствор и раствор стандартного образца амикацина.

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

 - *фактор асимметрии* *пика* (*AS*) амикацина должен быть не более 1,5;

 - *относительное стандартное отклонение* площади пика амикацина должно быть не более 1,5 % (6 определений).

Содержание амикацина сульфата C22H43N5O13·2H2SO4 в субстанции в процентах (*X*) в пересчёте на сухое вещество вычисляют по формуле:

$$X=\frac{S\_{1}∙a\_{0}∙10∙P∙100∙781,8}{S\_{0}∙a\_{1}∙10∙(100-W)∙585,6}=\frac{S\_{1}∙a\_{0}∙P∙100∙1,335}{S\_{0}∙a\_{1}∙(100-W)}$$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *S1* | – | площадь пика амикацина на хроматограмме испытуемого раствора; |
|  | *S0* | – | площадь пика амикацина на хроматограмме раствора стандартного образца амикацина; |
|  | *а1* | – | навеска субстанции, мг; |
|  | *а0* | – | навеска стандартного образца амикацина, мг; |
|  | *W* | – | потеря в массе при высушивании, %; |
|  | *P* | – | содержание амикацина в стандартном образце амикацина, %; |
|  | $$585,6$$ | – | молекулярная масса амикацина; |
|  | $$781,8$$ | – | молекулярная масса амикацина сульфата. |

***Сульфаты.*** От 23,3 до 25,8 %. В мерную колбу вместимостью 150 мл помещают 0,25 г субстанции, растворяют в 100 мл воды, доводят аммиака раствором 13,5 М до рН 11. Прибавляют 10,0 мл 0,1 М раствора бария хлорида и 0,5 мг фталеинового пурпурного.

Титруют 0,1 Мраствором натрияэдетата. Когда окраска начинает меняться, прибавляют 50 мл спирта 96 % и продолжают титрование до исчезновения фиолетово-синей окраски.

1 мл 0,1 Мраствора бария хлорида соответствует 9,606 мг сульфата.

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