**Тобрамицин ФС**

**Тобрамицин**

**Tobramycinum Взамен ВФС 42-2011-90**

*O*-3-Амино-3-дезокси-α-D-глюкопиранозил-(1→6)-*O*-[2,6-диамино-2,3,6-тридезокси-α-D-*рибо*-гексопиранозил-(1→4)]-2-дезокси-D-стрептамин



|  |  |
| --- | --- |
| C18H37N5O9 | М. м. 467,5 |

Cодержит не менее 97,0 % и не более 102,0 % тобрамицина C18H37N5O9 в пересчете на безводное и свободное от остаточных органических растворителей вещество.

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

**Растворимость**. Легко растворим в воде, очень мало растворим в спирте 96 %, практически нерастворим в хлороформе и эфире.

**Подлинность**

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

*2. Тонкослойная хроматография*. Определение проводят методом ТСХ (ОФС «Тонкослойная хроматография»). Растворы используют свежеприготовленными.

*Пластинка.* ТСХ пластинка со слоем силикагеля.

*Растворитель.* Бутанол—пиридин 100:1.

*Подвижная фаза (ПФ).* Хлороформ—аммония гидроксид—метанол 25:30:60

*Реактив для детектирования.*  В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 100 мг нингидрина и доводят объём раствора растворителем до метки.

*Испытуемый раствор.* В мерную колбу вместимостью 10 мл, помещают 60 мг субстанции, растворяют в 5 мл воды и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

*Раствор стандартного образца тобрамицина.* В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 60 мг стандартного образца тобрамицин, растворяют в 5 мл воды и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

*Раствор сравнения.* Испытуемый раствор— раствор стандартного образца тобрамицина 1:1.

На линию старта пластинки наносят по 3 мкл испытуемого раствора (18 мкг), раствора стандартного образца тобрамицина (18 мкг) раствора сравнения (18 мкг). Пластинку с нанесёнными пробами высушивают на воздухе в течение 5 -10 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 в сушильном шкафу при температуре 105-110 °С в течение 10 минут и опрыскивают реактивом для детектирования.

Зоны адсорбции на хроматограммах испытуемого раствора и раствора сравнения по положению, интенсивности окраски и величине должна соответствовать зоне адсорбции на хроматограмме раствора стандартного образца тобрамицина.

*3. Качественная реакция.* Растворяют 5,0 мг субстанции в 5 мл воды. Добавляют 5 мл раствора нингидрина и нагревают на водяной бане в течение 3 минут. Должна появиться фиолетово-синяя окраска.

*Раствор нингидрина.* В мерную колбу вместимостью 1 л помещают 1,0 г нингидрина, растворяют в спирте 96 % и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

**Удельное вращение.** От 138 до 148 (4 % раствор субстанции в воде ОФС «Поляриметрия»).

 Прозрачность раствора. Раствор 0,05 г субстанции в 1 мл воды не должен превышать эталон сравнения 1 (ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей»).

 **Цветность раствора.** Раствор, полученный в испытании «Прозрачность раствора», должен выдерживать сравнение с эталоном Y6 (ОФС «Степень окраски жидкостей», метод 2).

рН. От 9,0 до 11,0 (10 % раствор в воде, свободной от углерода диоксида, ОФС «Ионометрия», метод 3).

**Родственные примеси.** Определение проводят методом ТСХ (ОФС «Тонкослойная хроматография»). Растворы используют свежеприготовленными.

*Пластинка.* ТСХ пластинка со слоем силикагеля.

*Растворитель.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 29,2 мг натрия хлорида, растворяют в воде и доводят объём раствора водой до метки.

*Подвижная фаза (ПФ).* Вода—спирт 96%—растворитель 20:30:50.

*Реактив для детектирования А.*  В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 20 мл натрия гипохлорид раствора концентрированного и доводят объём раствора до метки водой.

*Реактив для детектирования Б.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 1,1 г калия йодида, растворяют в 60 мл воды, кипятят в течение 15 минут, постепенно добавляют взвесь 1,5 г крахмала растворимого в 10 мл воды. Добавляют 25 мл воды и кипятят в течение 10 минут. Охлаждают, доводят объём раствора водой до метки.

*Испытуемый раствор.* Растворяют 50 мг субстанции в 7 мл воды, доводят рН до 5,5 ± 0,4 серной кислотой раствором 0,5 М. Количественно переносят раствор в мерную колбу вместимостью 10 мл и доводят объём раствора водой до метки.

*Раствор сравнения.* В мерную колбу вместимостью 100 мл переносят 1 мл испытуемого раствора и доводят объём раствора водой до метки.

На линию старта пластинки наносят по 1 мкл испытуемого раствора (5 мкг), раствора сравнения (0,05 мкг). Пластинку с нанесёнными пробами высушивают на воздухе в течение 5 -10 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 в сушильном шкафу при температуре 105-110 °С в течение 10 минут и опрыскивают реактивом для детектирования А. Сушат пластинку в потоке холодного воздуха, опрыскивают реактивом для детектирования Б.

Зона адсорбции любой примеси на хроматограмме испытуемого раствора по совокупности величины и интенсивности окраски не должна превышать зону адсорбции на хроматограмме раствора сравнения (не более 1,0 %).

**Вода.** Не более 8,0 % (ОФС «Определение воды», метод 1). Для определения используют около 0,3 г (точная навеска) субстанции.

**Сульфатная зола.** Не более 0,3 % (ОФС «Сульфатная зола»). Для определения используют около 1,0 г (точная навеска) субстанции.

**Тяжелые металлы**. Не более 0,003 %. Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Тяжёлые металлы», метод 2, в зольном остатке, полученном после сжигания 1,0 г субстанции, с использованием эталонного раствора 1.

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

**Аномальная токсичность.** Субстанция должна быть нетоксичной (ОФС «Аномальная токсичность»). Тест-доза – 0,5 мг тобрамицина субстанции в 0,5 мл воды на мышь. Срок наблюдения 14 суток.

 **Бактериальные эндотоксины.** Не более 2,0 ЕЭ на 1мг тобрамицина (ОФС «Бактериальные эндотоксины.

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

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

*Подвижная фаза (ПФ).* В мерную колбу вместимостью 1 л помещают 1,0 г трис(гидроксиметил)аминометана, растворяют в 400 мл воды, добавляют 10 мл серной кислоты раствора 0,5 М, и доводят объём раствора ацетонитрилом до метки. Охлаждают. Раствор используют свежеприготовленным.

*Раствор фтординитробензола.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 1,0 г фтординитробензола, растворяют в 50 мл спирта 96 % и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

*Раствор трис(гидроксиметил)аминометана.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 1,5 г трис(гидроксиметил)аминометана, растворяют в 50 мл воды, доводят объём раствора тем же растворителем до метки. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 20 мл полученного раствора и доводят объём раствора диметилсульфоксидом до метки. Срок годности 4 часа.

*Испытуемый раствор.* В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают около 55 мг (точная навеска) субстанции, добавляют 1 мл серной кислоты раствора 0,5 М, и доводят объём раствора водой до метки. В мерную колбувместимостью 10 мл помещают 2 мл полученного раствора, и доводят объём раствора водой до метки. В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 4 мл полученного раствора, добавляют 10 мл раствора фтординитробензола и 10 мл раствора трис(гидроксиметил)аминометана, встряхивают и закрывают пробкой. Колбу нагревают в течении 50 мин при температуре 60ºС, затем охлаждают до комнатной температуры и доводят объём раствора ацетонитрилом до метки.

*Раствор стандартного образца тобрамицина.* В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают около 55 мг (точная навеска) стандартного образца тобрамицина, добавляют 1 мл серной кислоты раствора 0,5 М, и доводят объём раствора водой до метки. В мерную колбувместимостью 10 мл помещают 2 мл полученного раствора, и доводят объём раствора водой до метки. В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 4 мл полученного раствора, добавляют 10 мл раствора фтординитробензола и 10 мл раствора трис(гидроксиметил)аминометана, встряхивают и закрывают пробкой. Колбу нагревают в течении 50 мин при температуре 60ºС, затем охлаждают до комнатной температуры и доводят объём колбы ацетонитрилом до метки.

*Раствор для проверки разделительной способности хроматографической системы.* В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 0,012 г нафтолбензеина, растворяют в 30 мл ацетонитрила и доводят объём раствора тем же растворителем до метки. В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают  2  мл полученного раствора и доводят объём раствора раствором стандартного образца тобрамицина. Раствор используют свежеприготовленным.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка |  300 ×  3,9 мм, **силикагель октадецилсилильный для хроматографии**; |
| Температура колонки |  25 °С; |
| Скорость потока | 1,2 мл/мин; |
| Детектор | спектрофотометрический, 365 нм; |
|  Объём пробы | 20  мкл; |
| Время хроматографирования |  2,5- кратное от времени удерживания пика тобрамицина. |

Хроматографируют раствор для проверки разделительной способности хроматографической системы, раствор стандартного образца тобрамицина, испытуемый раствор.

*Относительные времена удерживания соединений.* Тобрамицин – 1 (около 9мин); нафтолбензеина – около 0,6.

*Пригодность хроматографической системы*. На хроматограмме раствора для проверки разделительной способности хроматографической системы *разрешение* (*Rs*) между пиками тобрамицина и нафтолбензеином должно быть не менее 4,0.

 На хроматограмме раствора стандартного образца тобрамицина *относительное стандартное отклонение* площади пика тобрамицина должно быть не более 2,0 % (6 определений).

Содержание тобрамицина C18H37N5O9 в субстанции в процентах (*X*) в пересчете на безводное и свободное от остаточных органических растворителей вещество вычисляют по формуле:

$$X=\frac{S\_{1}∙a\_{0}∙P∙ 50∙10∙50∙2∙4∙100}{S\_{0}∙a\_{1}∙2∙4∙50∙10∙50 ∙(100-W)}=\frac{S\_{1}∙a\_{0}∙P∙100}{S\_{0}∙a\_{1}∙(100-W)}$$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *S1* | – | площадь пика тобрамицина на хроматограмме испытуемого раствора; |
|  | *S0* | – | площадь пика тобрамицина на хроматограмме раствора стандартного образца тобрамицина; |
|  | *а1* | – | навеска субстанции, мг; |
|  | *а0* | – | навеска стандартного образца тобрамицина, мг; |
|  | *W* | – | содержание воды и остаточных органических растворителей в субстанции, %; |
|  | *P* | – | содержание тобрамицина в стандартном образце тобрамицина, %. |

**Хранение.** В защищенном от света месте.