**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |
| --- |
|  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Амикацина сульфат** |  | **ФС** |
| **Амикацин** |  |  |
| **Amikacini sulfas** |  | **Взамен ВФС 42-1879-89** |

|  |
| --- |
|  |

|  |
| --- |
|  |
| C22H43N5O13·2H2SO4 | М.м. 781,76 |
| [39831-55-5] |  |

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

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).

Субстанцию получают полусинтетическим путём из канамицина А. Cодержит не менее 96,5 % и не более 102,0 % амикацина сульфата C22H43N5O13·2H2SO4 в пересчёте на сухое вещество.

СВОЙСТВА

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

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

ИДЕНТИФИКАЦИЯ

*1.* *ИК-спектрометрия* (ОФС «Спектрометрия в средней инфракрасной области»)*.* Инфракрасный спектр субстанции в области от 4000 до 400 см–1 по положению полос поглощения должен соответствовать спектру фармакопейного 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 сульфата (раздел «Количественное определение»).

*3.* *ТСХ* (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 водой до метки.

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

*Раствор для проверки разделительной способности хроматографической системы.* В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 5 мг фармакопейного стандартного образца канамицина моносульфата, растворяют в 1 мл испытуемого раствора 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) и раствора для проверки разделительной способности хроматографической системы (по 2,5 мкг). Пластинку с нанесёнными пробами высушивают на воздухе в течение 5 мин, помещают в предварительно насыщенную в течение 1 ч камеру с ПФ и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт ПФ пройдёт около 80–90 % длины пластинки от линии старта, её вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей, опрыскивают нингидрина раствором уксусно-спиртовым 1,7 %, нагревают при 110 °C в течение 5 мин и просматривают при видимом свете.

*Пригодность хроматографической системы.* На хроматограмме раствора для проверки разделительной способности хроматографической системы должны обнаруживаться 2 разделённые зоны адсорбции.

*Результат*. Основная зона адсорбции на хроматограмме испытуемого раствора по положению, величине и окраске должна соответствовать зоне адсорбции амикацина на хроматограмме раствора стандартного образца амикацина сульфата.

*4. Качественная реакция.* Раствор 45 мг субстанции в 5 мл воды должен давать реакцию на сульфаты (ОФС «Общие реакции на подлинность»).

ИСПЫТАНИЯ

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

**Прозрачность раствора.** Раствор 2,0 г субстанции в 5 мл воды должен быть прозрачным (ОФС «Прозрачность и степень опалесценции (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 раствора.** От 2,0 до 4,0 (1 % раствор, ОФС «Степень окраски жидкостей», метод 3).

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

*Подвижная фаза А (ПФА).* В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 1,8 г натрия октансульфоната, 20 г натрия сульфата безводного, растворяют в воде, свободной от углерода диоксида, прибавляют 14 мл тетрагидрофурана и 50 мл калия дигидрофосфата раствора 0,2 М, предварительно доведённого фосфорной кислоты раствором 1 М до рН 3,0.

*Подвижная фаза Б (ПФБ).* В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 1,8 г натрия октансульфоната, 28 г натрия сульфата безводного, растворяют в воде, свободной от углерода диоксида, прибавляют 14 мл тетрагидрофурана и 50 мл калия дигидрофосфата раствора 0,2 М, предварительно доведённого фосфорной кислоты раствором 1 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 сравнения А*. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 1,0 мл испытуемого раствора и доводят объём раствора ПФА до метки.

*Раствор сравнения Б*. В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 1,0 мл раствора сравнения А и доводят объём раствора ПФА до метки.

*Стандартный раствор.* В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 5 мг фармакопейного стандартного образца амикацина для проверки пригодности хроматографической системы, содержащего примеси A, B, F и H, 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 фармакопейного стандартного образца примеси амикацина 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.

*Постколоночный раствор*. Смесь натрия гидроксида раствор насыщенный, свободный от карбонатов—вода, свободная от углерода диоксида 1:24, который добавляется беспульсовым образом к эффлюенту колонки с помощью полимерной смесительной спирали объёмом 375 мкл.

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 [50725-24-1].

Примесь B: 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 [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 [197909-67-4].

Примесь H: 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 [48237-20-3].

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

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 250 × 4,6 мм, силикагель октадецилсилильный, эндкепированный, для хроматографии, 5 мкм; |
| Температура колонки | 40 °С; |
| Скорость потока | 1,0 мл/мин; |
| Детектор | импульсный амперометрический или эквивалентный с золотым индикаторным электродом, хлорсеребряным электродом сравнения и вспомогательным электродом из нержавеющей стали, образующим корпус ячейки;потенциал детекции +0,05 В;потенциал окисления +0,75 В;потенциал восстановления −0,15 В; |
| Объём пробы | 20 мкл; |
| Скорость постколоночного раствора | 0,3 мл/мин. |

*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  |

Хроматографируют раствор для проверки чувствительности хроматографической системы, растворы сравнения А и Б, стандартный раствор и раствор стандартного образца примеси I.

*Относительное время удерживания соединений*. Амикацина сульфат – 1 (около 28 мин); примесь I – около 0,13; примесь F – около 0,92; примесь B – около 0,95; примесь A – около 1,62; примесь H – около 1,95.

Для идентификации пиков примесей A, B, F и H используют хроматограмму стандартного раствора и хроматограмму, прилагаемую к фармакопейному стандартному образцу амикацина для проверки пригодности системы. Для идентификации пика примеси I используют хроматограмму раствора стандартного раствора I.

*Пригодность хроматографической системы.* На хроматограмме стандартного раствора *отношение максимум/минимум (p/v)* между пиками примеси В и амикацина сульфата должно быть не менее 5.

*Допустимое содержание примесей.* На хроматограмме испытуемого раствора:

- площадь пика примеси I не должна превышать площади пика примеси I на хроматограмме раствора стандартного образца примеси I (не более 0,5 %);

- площадь пика каждой из примесей A, B, F и H не должна превышать 0,5 площади основного пика на хроматограмме раствора сравнения А (не более 0,5 %);

- площадь пика любой другой примеси не должна превышать 0,5 площади основного пика на хроматограмме растворасравненияА (не более 0,5 %);

- сумма площадей пиков всех примесей не должна превышать 1,5 площади основного пика на хроматограмме растворасравненияА (не более 1,5 %).

Не учитывают пики, площадь которых менее площади основного пика на хроматограмме растворасравнения Б (менее 0,1 %).

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

**Сульфаты.** От 23,3 до 25,8 % в пересчёте на сухое вещество. Определение проводят методом титриметрии (ОФС «Титриметрия (титриметрические методы анализа)»).

Растворяют 0,25 г (точная навеска) субстанции в 100 мл воды, доводят значение pH аммиака раствором концентрированным 25 % до 11,0. Прибавляют 10,0 мл 0,1 М раствора бария хлорида и 0,5 мг фталеинового пурпурного.

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

Параллельно проводят контрольный опыт.

Разность объёмов 0,1 М раствора натрия эдетата соответствует объёму 0,1 М раствора бария хлорида, прореагировавшего с сульфатами.

Содержание сульфата SO4 в пересчёте на сухое вещество в процентах (*Х*) вычисляют по формуле:

$$X=\frac{(V\_{0}–V\_{1})∙K∙9,606∙100∙100}{a∙(100-W)},$$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | $$V\_{1}$$ | − | объём 0,1 М раствора натрия эдетата, израсходованный на титрование в основном опыте, мл; |
|  | $$V\_{0}$$ | − | объём 0,1 М раствора натрия эдетата, израсходованный на титрование в контрольном опыте, мл; |
|  | $$a$$ | – | навеска субстанции, мг; |
|  | $$K$$ | − | поправочный коэффициент 0,1 М раствора натрия эдетата; |
|  | $$9,606$$ | − | количество сульфата, мг, соответствующее 1 мл 0,1 М раствора бария хлорида, мг/мл; |
|  | $$W$$ | – | потеря в массе при высушивании, %. |

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

**Тяжёлые металлы.** Не более 0,001 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Тяжёлые металлы» (метод 3Б) в зольном остатке, полученном в испытании «Сульфатная зола», 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 – 1,0 мг амикацина в 0,5 мл натрия хлорида раствора 0,9 % для инъекций на мышь, внутривенно. Срок наблюдения – 48 ч.

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

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

**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 1000 мл 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 1 М до рН 3,0.

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

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

*Хроматографические условия*

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

Хроматографируют раствор стандартного образца амикацина и испытуемый раствор.

Время удерживанияамикацина – около 30 мин.

*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 введений).

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

$$X=\frac{S\_{1}∙a\_{0}∙10∙P∙100∙781,76}{S\_{0}∙a\_{1}∙10∙(100-W)∙585,60} ,$$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | $$S\_{1}$$ | – | площадь пика амикацина на хроматограмме испытуемого раствора; |
|  | $$S\_{0}$$ | – | площадь пика амикацина на хроматограмме раствора стандартного образца амикацина; |
|  | $$a\_{1}$$ | – | навеска субстанции, мг; |
|  | $$a\_{0}$$ | – | навеска фармакопейного стандартного образца амикацина, мг; |
|  | $$W$$ | – | потеря в массе при высушивании, %; |
|  | $$P$$ | – | содержание амикацина в фармакопейном стандартном образце амикацина, %; |
|  | $$585,60$$ | – | молекулярная масса амикацина; |
|  | $$781,76$$ | – | молекулярная масса амикацина сульфата. |

ХРАНЕНИЕ

В герметично закрытой упаковке.

\*Испытание проводят для субстанции, предназначенной для производства лекарственных препаратов для парентерального применения.