**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |
| --- |
|  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Гентамицина сульфат** |  | **ФС.2.1.0082** |
| **Гентамицин** |  |  |
| **Gentamicini sulfas** |  | **Взамен ФС.2.1.0082.18** |

|  |
| --- |
|  |

|  |
| --- |
|  |
| C1a | R=CH2NH2 | C19H39N5O7·H2SO4 | М.м. 547,6 |
| C1 | R=CH(CH3)NHCH3 | C21H43N5O7·H2SO4 | М.м. 575,7 |
| C2 | R=(*R*)-CH(CH3)NH2 | C20H41N5O7·H2SO4 | М.м. 561,6 |
| C2a | R=(*S*)-CH(CH3)NH2 | C20H41N5O7·H2SO4 | М.м. 561,6 |
| C2b | R=CH2NHCH3 | C20H41N5O7·H2SO4 | М.м. 561,6 |

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Смесь сульфатов гентамицина C1, гентамицина C1A, гентамицина C2A, гентамицина C2B и гентамицина C2, производимых *Micromonospora purpurea.*

**Гентамицин C1a**: *O*-3-Дезокси-4-*C*-метил-3-(метиламино)-β-L-арабинопиранозил-(1→6)-*O*-[2,6-диамино-2,3,4,6-тетрадезокси-α-D-*эритро*-гексопиранозил-(1→4)]-2-дезокси-D-стрептамина сульфат (1:1).

**Гентамицин C1**: *O*-3-дезокси-4-*C*-метил-3-(метиламино)-β-L-арабинопиранозил-(1→6)-*O*-[2-амино-2,3,4,6,7-пентадезокси-6-(метиламино)-α-D-*эритро*-гептопиранозил-(1→6)]-2-дезокси-D-стрептамина сульфат (1:1).

**Гентамицин C2**: *O*-3-дезокси-4-*C*-метил-3-(метиламино)-β-L-арабинопиранозил-(1→6)-*O*-[(6*R*)-2,6-диамино-2,3,4,6,7-пентадезокси-α-D-*эритро*-гептопиранозил-(1→4)]-2-дезокси-D-стрептамина сульфат (1:1).

**Гентамицин C2a**: *O*-3-дезокси-4-*C*-метил-3-(метиламино)-β-L-арабинопиранозил-(1→6)-*O*-[(6*S*)-2,6-диамино-2,3,4,6,7-пентадезокси-α-D-*эритро*-гептопиранозил-(1→4)]-2-дезокси-D-стрептамина сульфат (1:1).

**Гентамицин C2b**: *O*-3-дезокси-4-*C*-метил-3-(метиламино)-β-L-арабинопиранозил-(1→6)-*O*-[2-амино-2,3,4,6-тетрадезокси-6-метил-6-(метиламино)-α-D-*эритро*-гексопиранозил-(1→4)]-2-дезокси-D-стрептамина сульфат (1:1).

1 мкг гентамицина сульфата соответствует специфической активности, равной одной единице действия (ЕД).

СВОЙСТВА

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

\*Гигроскопичен.

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

ИДЕНТИФИКАЦИЯ

*1. ВЭЖХ.* Время удерживания пяти основных пиков на хроматограмме испытуемого раствора Б должно соответствовать времени удерживания пяти основных пиков гентамицина, на хроматограмме раствора для идентификации пиков (раздел «Компонентный состав»).

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

*Пластинка.* ТСХ пластинка со слоем силикагеля.

*Подвижная фаза (ПФ).* Аммиака раствор концентрированный 25 %—метанол—хлороформ 33:33:33. После смешивания используют нижний слой.

*Испытуемый раствор.* В мерную колбу вместимостью 5 мл помещают около 25 мг субстанции, растворяют в воде и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

*Раствор стандартного образца гентамицина сульфата.* В мерную колбу вместимостью 5 мл помещают около 25 мг фармакопейного стандартного образца гентамицина сульфата, растворяют в воде и доводят объём раствора тем де растворителем до метки.

На линию старта пластинки наносят по 10 мкл (50 мкг) испытуемого раствора и раствора стандартного образца гентамицина сульфата. Пластинку с нанесёнными пробами сушат на воздухе, помещают в камеру с ПФ и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт подвижной фазы пройдёт около 80–90 % длины пластинки от линии старта, её вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей, опрыскивают нингидрина раствором 0,25 %, выдерживают в сушильном шкафу при температуре 110 °С в течение 5 мин и просматривают в видимом свете.

На хроматограмме испытуемого раствора должны наблюдаться три основные зоны адсорбции, соответствующие по положению, величине и интенсивности поглощения основным зонам адсорбции на хроматограмме раствора стандартного образца гентамицина сульфата.

*3. Качественная реакция.* Субстанция должна давать характерную реакцию на сульфаты (ОФС «Общие реакции на подлинность»).

ИСПЫТАНИЯ

**Удельное вращение.** От +107 до +121 в пересчёте на безводное вещество (10 % раствор субстанции в воде, ОФС «Оптическое вращение»).

**Прозрачность раствора.** Раствор 0,8 г субстанции в 20 мл воды должен быть прозрачным (ОФС «Прозрачность и степень опалесценции (мутности) жидкостей»).

**Цветность раствора.** Окраска раствора, полученного в испытании «Прозрачность раствора», не должна превышать интенсивности наиболее близко подходящего по цвету эталона сравнения 6 (ОФС «Степень окраски жидкостей»).

**рН раствора.** От 3,5 до 5,5 (раствор, полученный в испытании «Прозрачность раствора», ОФС «Ионометрия», метод 3).

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

*Раствор А*. Натрия гидроксида раствор насыщенный, свободный от карбонатов—вода 1:25.

*Подвижная фаза (ПФ).* К 900 мл воды прибавляют 7,0 мл трифторуксусной кислоты, 0,25 мл пентафторпропановой кислоты, 4,0 мл натрия гидроксида раствора насыщенного, свободного от карбонатов, перемешивают и доводят рН раствором А до 2,60. Полученный раствор количественно переносят в мерную колбу вместимостью 1000 мл, прибавляют 15 мл ацетонитрила и доводят объём раствора водой до метки.

*Испытуемый раствор А.* В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 0,25 г гентамицина сульфата, растворяют в ПФ и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

*Испытуемый раствор Б.* В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 5,0 мл испытуемого раствора А и доводят объём раствора ПФ до метки.

*Раствор для идентификации пиков.* В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 5 мг фармакопейного стандартного образца гентамицина для идентификации пиков, содержащего примесь В, растворяют в ПФ и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

*Раствор стандартного образца сизомицина сульфата.* В мерную колбу вместимостью 20 мл помещают 20 мг фармакопейного стандартного образца сизомицина сульфата (примесь А), растворяют в ПФ и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

*Раствор для проверки чувствительности хроматографической системы*. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 1,0 мл раствора стандартного образца сизомицина сульфата и доводят объём раствора ПФ до метки.

*Раствор для проверки разделительной способности хроматографической системы.* В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 1,0 мл раствора стандартного образца сизомицина сульфата, прибавляют 5,0 мл испытуемого раствора А и доводят объём раствора ПФ до метки.

*Раствор для постколоночной дериватизации*. Раствор А, предварительно дегазированный, безимпульсно добавляется к элюату колонки с помощью смешивающей полимерной петли объёмом 375 мкл.

Примечание

Примесь A: *O*-3-дезокси-4-*C*-метил-3-(метиламино)-β-L-арабинопиранозил-(1→6)-*O*-[2,6-диамино-2,3,4,6-тетрадезокси-α-D-*эритро*-гекс-4-енопиранозил-(1→4)]-2-дезокси-D-стрептамин [32385-11-8].

Примесь B: *O*-3-дезокси-4-*C*-метил-3-(метиламино)-β-L-арабинопиранозил-(1→4)-2-дезокси-L-стрептамин [49751-51-1].

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 250 × 4,6 мм, силикагель октадецилсилильный для хроматографии, 5 мкм; |
| Температура колонки | 35°C; |
| Скорость потока | 1,0 мл/мин; |
| Раствор после колонки | натрия гидроксида раствор 20 % (свежеприготовленный); |
| Детектор | пульс-амперометрический с золотым индикаторным электродом, хлорсеребряным электродом сравнения и стальным вспомогательными электродом, представляющим собой корпус электрохимической ячейки; потенциалы: +0,05 В детектирование, +0,75 В окисление, –0,15 В восстановление с продолжительностью импульса в соответствии с используемым инструментом; |
| Объём пробы | 20 мкл; |
| Время хроматографирования | 1,2-кратное от времени удерживания пика гентамицина С1. |

Примечание – Если при проведении испытания наблюдается значительный дрейф времени удерживания компонентов растворов, следует предусмотреть промывку колонки между инжекциями смесью ацетонитрил—вода очищенная 80:20 в течение 15–30 мин с последующим уравновешиванием колонки подвижной фазой.

Хроматографируют раствор для проверки чувствительности хроматографической системы, раствор для проверки разделительной способности хроматографической системы, раствор для идентификации пиков и испытуемый раствор Б.

*Относительное время удерживания*. Примесь А – 1,0 (около 23 мин); гентамицин С1А – около 1,1; гентамицин С2 – около 1,8; гентамицин С2B – около 2,0; гентамицин С2А – около 2,3; гентамицин С1 – около 3,0.

*Идентификация примесей*. Для идентификации пиков гентамицина С1, С1А, С2, С2А, С2B используют хроматограмму раствора для идентификации пиков и хроматограмму, прилагаемую к фармакпейному стандартному образцу гентамицина для идентификации пиков.

*Пригодность хроматографической системы*

На хроматограмме раствора для проверки чувствительности хроматографической системы *отношение сигнал/шум* (*S/N*) для пика сизомицина должно быть не менее 10.

На хроматограмме раствора для проверки разделительной способности хроматографической системы:

- *разрешение* (*RS*) между пиками сизомицина и гентамицина С1А должно бытьне менее 1,2 (при необходимости увеличивают долю ацетонитрила в ПФ до 50 мл/л);

- *разрешение* (*RS*) между пиками гентамицина С2 и гентамицина С2В должно бытьне менее 1,5 (при необходимости увеличивают долю ацетонитрила в ПФ до дополнительных 50 мл/л).

*Допустимое содержание компонентов.* Содержание каждого компонента в субстанции в процентах вычисляют методом нормирования (ОФС «Хроматография»):

- гентамицин С1 – от 25,0 до 45,0 %;

- гентамицин С1А – от 10,0 до 30,0 %;

- сумма гентамицинов С2, С2А и С2B – от 35,0 до 55,0 %.

**Родственные примеси.** Определение проводят методом ВЭЖХ в условиях испытания «Компонентный состав» со следующими изменениями.

Хроматографируют раствор для проверки чувствительности хроматографической системы и испытуемый раствор А.

*Допустимое содержание примесей:*

*-*площадь пика каждой из примесей А и В не должна более чем в 3 раза превышать площадь основного пика на хроматограмме раствора для проверки чувствительности хроматографической системы (не более 3 %);

- площадь пика любой другой примеси не должна более чем в 3 раза превышать площадь основного пика на хроматограмме раствора для проверки чувствительности хроматографической системы (не более 3 %);

- сумма площадей пиков всех примесей не должна более чем в 10 раз превышать площадь основного пика на хроматограмме раствора для проверки чувствительности хроматографической системы (не более 10 %).

Не учитывают пики, площадь которых составляет менее 0,5 площади основного пика на хроматограмме раствора для проверки чувствительности хроматографической системы (менее 0,5 %).

**Метанол.** Не более 1,0 %. Определение проводят методом ГХ (ОФС «Газовая хроматография»).

*Раствор внутреннего стандарта*. В мерную колбу вместимостью 200 мл помещают 0,2 г пропанола, прибавляют 20 мл воды, перемешивают и доводят объём раствора водой до метки.

*Испытуемый раствор.* В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 0,1 г (точная навеска) субстанции, растворяют в 5 мл воды, прибавляют 1,0 мл раствора внутреннего стандарта, доводят объём раствора водой до метки и перемешивают. Помещают 1,0 мл полученного раствора во флакон для парофазного анализа вместимостью 10 мл и герметично закрывают.

*Стандартный раствор.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 0,1 г (точная навеска) метанола, прибавляют 20 мл воды, доводят объём раствора водой до метки и перемешивают. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 10,0 мл полученного раствора, прибавляют 1,0 мл раствора внутреннего стандарта, доводят объём раствора водой до метки и перемешивают. Помещают 1,0 мл полученного раствора во флакон для парофазного анализа вместимостью 10 мл и герметично закрывают.

*Контрольный раствор.* Помещают 1,0 мл воды во флакон для парофазного анализа вместимостью 10 мл и герметично закрывают.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | кварцевая капиллярная 30 м × 0,53 мм, покрытая слоем полиэтиленгликоля, деактивированного по отношению к основаниям,0,5 мкм; |
| Детектор | пламенно-ионизационный; |
| Газ-носитель | азот; |
| Деление потока | 1:4; |
| Скорость потока | 1,7 мл/мин; |
| Объём пробы | 1 мкл. |

*Температурная программа*

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | Время, мин | Температура, °C |
| Колонка | 0–5 | 40 |
| 5–11 | 40 → 100 |
| Инжектор |  | 150 |
| Детектор |  | 200 |

*Условия парофазного анализа*

|  |  |
| --- | --- |
| Температура уравновешивания | 80 °С; |
| Время уравновешивания | 45 мин; |
| Температура петли | 90 °С; |
| Температура линии переноса | 100 °С. |

Хроматографируют контрольный раствор, стандартный и испытуемый растворы.

Содержание метанола в субстанции в процентах (*Х*) вычисляют по формуле:

$$Х=\frac{B\_{1}∙a\_{0}∙10∙10∙P}{B\_{0}∙a\_{1}∙100∙100} ,$$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | $$B\_{1}$$ | − | отношение площади пика метанола к площади пика пропанола на хроматограмме испытуемого раствора; |
|  | $$B\_{0}$$ | − | отношение площади пика метанола к площади пика пропанола на хроматограмме стандартного раствора; |
|  | $$a\_{1}$$ | − | навеска испытуемой субстанции, г; |
|  | $$a\_{0}$$ | − | навеска метанола, взятая для приготовления стандартного раствора, г; |
|  | $$P$$ | – | чистота метанола, %. |

**Сульфаты**. От 32,0 до 35,0 % в пересчёте на безводное вещество. Растворяют 0,25 г (точная навеска) субстанции в 100 мл воды и доводят значение рН до 11,0 аммиака раствором концентрированным 32 %. Прибавляют 10,0 мл 0,1 М раствора бария хлорида и около 0,5 мг фталеинового пурпурного. Титруют 0,1 М раствором натрия эдетата, прибавляя 50 мл спирта 96 % при начале изменения окраски, до исчезновения фиолетово-синего окрашивания.

Параллельно проводят контрольный опыт.

1 мл 0,1 М раствора бария хлорида соответствует 9,606 мг сульфат-иона SO4.

**Сульфатная зола**. Не более 1,0 % (ОФС «Сульфатная зола»). Для определения используют 0,5 г (точная навеска) субстанции.

**Вода.**Не более 15,0 % (ОФС «Определение воды»). Для определения используют 0,3 г (точная навеска) субстанции.

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

\***Аномальная токсичность**. Субстанция должна быть нетоксичной (ОФС «Аномальная токсичность»). Тест-доза – 0,5 мг гентамицина в 0,5 мл воды для инъекций на мышь, внутривенно. Скорость введения – 0,1 мл/с. Срок наблюдения – 48 ч.

\***Бактериальные эндотоксины**. Не более 0,71 ЕЭ на 1 мг гентамицина (ОФС «Бактериальные эндотоксины»).

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

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

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Определение антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар».

ХРАНЕНИЕ

В защищённом от света месте в герметично закрытой упаковке.

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