МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |
| --- |
|  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Тобрамицин** |  | **ФС.2.1.0485** |
| **Тобрамицин** |  |  |
| **Tobramycinum** |  | **Взамен ВФС 42-2011-90** |

|  |
| --- |
|  |

|  |
| --- |
|  |
| C18H37N5O9 | М.м. 467,51 |
| [32986-56-4] |  |

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

*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.

Тобрамицин получают с использованием штаммов *Streptomyces tenebrarius* или другим способом.

Cодержит не менее 900 мкг на 1 мг тобрамицина C18H37N5O9 в пересчёте на безводное и свободное от остаточных органических растворителей вещество.

СВОЙСТВА

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

\*Гигроскопичен.

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

ИДЕНТИФИКАЦИЯ

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

Растворы используют свежеприготовленными.

*Пластинка.* ТСХ пластинка со слоем силикагеля.

*Подвижная фаза (ПФ).* Хлороформ—аммиака раствор концентрированный 25 %—метанол 25:30:60.

*Реактив для детектирования.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 1,0 г нингидрина, растворяют в смеси пиридин—бутанол 1:100 и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

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

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

*Стандартный раствор.* Смешивают равные объёмы испытуемого раствора и раствора стандартного образца тобрамицина.

На линию старта пластинки наносят по 3 мкл испытуемого раствора (18 мкг), раствора стандартного образца тобрамицина (18 мкг) и стандартного раствора (18 мкг). Пластинку с нанесёнными пробами высушивают на воздухе, помещают в 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, выдерживают в сушильном шкафу при температуре 110 °С в течение 15 мин, опрыскивают реактивом для детектирования и просматривают при дневном свете.

*Результат.* Основные зоны адсорбции на хроматограмме испытуемого и стандартного раствора по положению, интенсивности окраски и величине должны соответствовать основным зонам адсорбции на хроматограмме раствора стандартного образца тобрамицина.

*3. Качественная реакция.* Растворяют 5,0 мг субстанции в 5 мл воды, прибавляют 5 мл раствора нингидрина, нагревают на водяной бане в течение 3 мин; должно появиться фиолетово-синее окрашивание.

*Раствор нингидрина.* В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 1,0 г нингидрина, растворяют в спирте 96 % и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

ИСПЫТАНИЯ

**Удельное вращение.** От +138 до +148 в пересчёте на безводное вещество (4 % раствор субстанции в воде, ОФС «Оптическое вращение»).

**Прозрачность раствора.** Раствор 50 мг субстанции в 1 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 Y6 (ОФС «Степень окраски жидкостей», метод 2).

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

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

Растворы используют свежеприготовленными.

*Пластинка.* ТСХ пластинка со слоем силикагеля.

*Раствор натрия хлорида.* Растворяют 29,2 г натрия хлорида в 100 мл воды.

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

*Испытуемый раствор.* В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 50 мг субстанции, растворяют в 7 мл воды, доводят значение рН до 5,5 серной кислоты раствором 0,5 М и доводят объём раствора водой до метки.

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

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

*Реактив для детектирования (Б).* Растворяют 1,1 г калия йодида в 60 мл воды, кипятят в течение 15 мин, медленно прибавляют суспензию 1,5 г крахмала растворимого в 10 мл воды, прибавляют 25 мл воды и кипятят в течение 10 мин. Полученный раствор охлаждают до комнатной температуры, переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят объём раствора водой до метки.

На линию старта пластинки наносят по 1 мкл испытуемого раствора (5 мкг) и раствора сравнения (0,05 мкг). Пластинку с нанесёнными пробами сушат на воздухе, помещают в камеру с ПФ и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт ПФ пройдет около 80–90 % длины пластинки от линии старта, её вынимают из камеры, сушат в потоке горячего воздуха до удаления следов растворителей, выдерживают в сушильном шкафу при температуре 110 °С в течение 10 мин. Горячую пластинку обрабатывают реактивом для детектирования (А), сушат в потоке холодного воздуха, пока при добавлении капли реактива для детектирования (Б) зона адсорбции, расположенная ниже основной зоны адсорбции, не приобретёт бледно-голубое окрашивание. Затем обрабатывают пластинку реактивом для детектирования (Б) и просматривают в дневном свете. Зона адсорбции, расположенная ниже основной зоны адсорбции, из бледно-голубого окрашивания переходит в голубовато-фиолетовое.

*Допустимое содержание примесей.* На хроматограмме испытуемого растворазона адсорбции любой примеси по совокупности величины и интенсивности окраски не должна превышать зону адсорбции тобрамицина на хроматограмме раствора сравнения (не более 1,0 %).

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

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

**Тяжёлые металлы**. Не более 0,003 %. Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Тяжёлые металлы» (метод 3Б) в зольном остатке, полученном после сжигания 0,33 г субстанции, с использованием эталонного раствора 1, или методом 12.

**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 в 0,5 мл натрия хлорида раствора 0,9 % для инъекций на мышь, внутривенно. Срок наблюдения – 48 ч.

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

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

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

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ

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

*Подвижная фаза (ПФ).* В мерную колбу вместимостью 2000 мл помещают 2,0 г трис(гидроксиметил)аминометана, растворяют в 800 мл воды, прибавляют 20 мл серной кислоты раствора 0,5 М, доводят объём раствора ацетонитрилом до метки, охлаждают до комнатной температуры и фильтруют через фильтр с размером пор 0,2 мкм.

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

*Раствор трис(гидроксиметил)аминометана.* В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 0,75 г трис(гидроксиметил)аминометана, растворяют в воде и доводят объём раствора водой до метки. В мерную колбу вместимостью 200 мл помещают 40,0 мл полученного раствора и доводят объём раствора диметилсульфоксидом до метки. Срок годности раствора – 4 ч.

*Испытуемый раствор.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 67 мг (точная навеска) субстанции, растворяют в воде и доводят объём раствора водой до метки.

*Раствор стандартного образца тобрамицина.* В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 11 мг (точная навеска) фармакопейного стандартного образца тобрамицина, прибавляют 0,2 мл серной кислоты раствора 0,5 М, растворяют в воде и доводят объём раствора водой до метки. В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 2,0 мл полученного раствора и доводят объём раствора водой до метки.

*Дериватизация растворов.* В отдельные мерные колбы вместимостью 50 млпомещают по 4,0 мл испытуемого раствора, раствора стандартного образца тобрамицина и воды, прибавляют по 10,0 мл раствора фтординитробензола, по 10,0 мл раствора трис(гидроксиметил)аминометана, перемешивают, герметично закрывают, нагревают на водяной бане при температуре 60 °С в течение 50 мин, вынимают из водяной бани, оставляют на 10 мин, прибавляют ацетонитрил, почти доводя объём растворов до метки, охлаждают до комнатной температуры и доводят объём растворов ацетонитрилом до метки.

*Раствор для проверки разделительной способности хроматографической системы.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 24 мг нафтолбензеина, растворяют в ацетонитриле и доводят объём раствора ацетонитрилом до метки. В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 2,0 мл полученного раствора и доводят объём раствора дериватизированным раствором стандартного образца тобрамицина до метки. Раствор используют сразу после приготовления.

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 300 × 3,9 мм, **силикагель октадецилсилильный для хроматографии, 5 мкм**; |
| 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 способностихроматографической системы и дериватизированные растворы.

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

*Пригодность хроматографической системы.* На хроматограмме раствора для проверки разделительной способностихроматографической системы *разрешение (RS)* между пиками нафтолбензеина и тобрамицина 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 мкг/мг в пересчёте на безводное и свободное от остаточных органических растворителей вещество (*X*) вычисляют по формуле:

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

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *S*1 | – | площадь пика тобрамицина на хроматограмме испытуемого раствора; |
|  | *S*0 | – | площадь пика тобрамицина на хроматограмме раствора стандартного образца тобрамицина; |
|  | *а*1 | – | навеска субстанции, мг; |
|  | *а*0 | – | навеска фармакопейного стандартного образца тобрамицина, мкг; |
|  | *P* | – | содержание тобрамицина в фармакопейном стандартном образце тобрамицина, мкг/мг; |
|  | *W* | – | содержание воды и остаточных органических растворителей в субстанции, %. |

ХРАНЕНИЕ

В герметично укупоренной упаковке.

\*Приводится для информации.

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