**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |
| --- |
|  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Тобрамицина сульфат** |  | **ФС.2.1.0486** |
| **Тобрамицин** |  |  |
| **Tobramycini sulfas** |  | **Вводится впервые** |

|  |
| --- |
|  |

|  |
| --- |
|  |
| (C18H37N5O9)2·5H2SO4 | М.м. 1425,4 |
| [79645-27-5] |  |

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-стрептамина сульфат (2:5).

Содержит не менее 634 мкг и не более 739 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, практически нерастворим в спирте 96 %.

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

*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 5 мл помещают 92 мг субстанции, растворяют в воде и доводят объём раствора водой до метки.

*Раствор стандартного образца тобрамицина.* В мерную колбу вместимостью 5 мл помещают около 30 мг фармакопейного стандартного образца тобрамицина, растворяют в воде и доводят объём раствора водой до метки.

*Стандартный раствор.* 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) и стандартного раствора (18 мкг). Пластинку с нанесёнными пробами высушивают на воздухе, помещают в 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, выдерживают в сушильном шкафу при температуре 110 °С в течение 15 мин, обрабатывают раствором 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.* Субстанция должна давать характерную реакцию на сульфаты (ОФС «Общие реакции на подлинность»).

ИСПЫТАНИЯ

**pH.** От 6,0 до 8,0 (4 % раствор, ОФС «Ионометрия», метод 3).

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

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 пройдёт около 80–90 % длины пластинки от линии старта, её вынимают из камеры, сушат в токе 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 7,0 % (ОФС «Определение воды», метод 1). Для определения используют 1 г (точная навеска) субстанции.

**Сульфатная зола.** Не более 1,0 % (ОФС «Сульфатная зола»). Для определения используют 1 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 – 0,5 мг тобрамицина в 0,5 мл воды для инъекций на мышь, внутривенно. Срок наблюдения – 48 ч.

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

**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 спиртом 96 % 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 км; |
| Температура колонки | 25 °С; |
| Скорость потока | 1,2 мл/мин; |
| Детектор | спектрофотометрический, 365 нм; |
| Объём пробы | 20 мкл; |
| Время хроматографирования | 2-кратное от времени удерживания пика тобрамицина. |

Хроматографируют раствор для проверки разделительной способностихроматографической системы и дериватизированные растворы.

*Относительное время 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:

$$X=\frac{S\_{1}∙a\_{0}∙P∙100∙2∙100∙1425,4}{S\_{0}∙a\_{1}∙10∙10∙(100-W)∙467,5},$$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 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, %; |
|  | 1425,4 | – | молекулярная масса тобрамицина сульфата, |
|  | 467,5 | – | молекулярная масса тобрамицина. |

ХРАНЕНИЕ

В герметично укупоренной упаковке.

\*Приводится для информации.