**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |
| --- |
| ФС.0.0.0000 |
| **АМФОТЕРИЦИН B** |
| *Amphotericinum B* |
| Amphotericin B |
|  |
| C47H73NO17 | *M*r 924 |
| [1397-89-3] |  |

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Смесь противогрибковых полиенов, продуцируемых в процессе роста определённых штаммов *Streptomyces nodosus* или полученных другими способами, основным компонентом которой является амфотерицин B: (1*R*,3*S*,5*R*,6*R*,9*R*,11*R*,15*S*,16*R*,17*R*,18*S*,19*E*,21*E*,23*E*,25*E*,27*E*,29*E*,31*E*,33*R*,35*S*,36*R*,37*S*)-33-[(3-амино-3,6-дидезокси-β-D-маннопиранозил)окси]-1,3,5,6,9,11,17,37-октагидрокси-15,16,18-триметил-13-оксо-14,39-диоксабицикло[33.3.1]нонатриаконта-19,21,23,25,27,29,31-гептаен-36-карбоновая кислота.

*Содержание*: не менее 750 МЕ/мг в пересчёте на сухую субстанцию.

СВОЙСТВА

***Описание*.** Жёлтый или оранжевый порошок.

Гигроскопичен.

***Растворимость*.** Практически нерастворим в воде, растворим в диметилсульфоксиде и пропиленгликоле, мало растворим в диметилформамиде, очень мало растворим в метаноле и практически нерастворим в этаноле 96 %.

В разбавленных растворах чувствителен к свету.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ

*Первая идентификация: Б, В.*

*Вторая идентификация: А, Г.*

А.**Спектрофотометрия** *(ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях»)*.

*Испытуемый раствор*. 25 мг испытуемого образца растворяют в 5 мл *диметилсульфоксида* и доводят объём раствора *метанолом* до 50 мл. 2 мл полученного раствора доводят *метанолом* до объёма 200 мл.

*Спектральный диапазон:* 300–450 нм.

*Максимумы поглощения:* 362 нм; 381 нм и 405 нм.

*Отношение оптических плотностей:*

- А362/А381 от 0,57 до 0,61;

- А381/А405 от 0,87 до 0,93.

Б. **ИК-спектрометрия** *(ОФС «Спектрометрия в средней инфракрасной области»).*

*Образец сравнения:* фармакопейный стандартный образец *амфотерицин B*.

*Требование:* инфракрасный спектр испытуемого образца должен соответствовать инфракрасному спектру фармакопейного стандартного образца *амфотерицина B*.

Если полученные спектры различаются, испытуемый образец и образец сравнения высушивают под давлением не более 0,7 кПа при 60 °С в течение 1 ч и записывают новые спектры.

В.**Жидкостная хроматография.** Используют хроматограммы, полученные в испытании «Родственные примеси».

*Требование:* на хроматограмме испытуемого раствора при длине волны 383 нм время удерживания основного пика должно соответствовать времени удерживания основного пика амфотерицина B на хроматограмме раствора сравнения (а).

Г. 0,5 г испытуемого образца растворяют в *диметилсульфоксиде* и доводят объём раствора тем же растворителем до 1000 мл. К 1 мл полученного раствора прибавляют 5 мл *фосфорной кислоты концентрированной* до образования нижнего слоя, не допуская смешивания двух жидкостей; на границе жидкостей сразу же образуется синее кольцо; при смешивании появляется синее окрашивание. К полученному раствору прибавляют 15 мл *воды* и перемешивают; раствор окрашивается в бледно-жёлтый цвет.

ИСПЫТАНИЯ

**Родственные примеси.** Метод ВЭЖХ *(ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография»).*

*Растворы хранят в защищённом от света месте и используют в течение 24 ч после приготовления. Раствор сравнения (в) готовят непосредственно перед использованием.*

*Смесь растворителей:* раствор 10 г/л *аммония ацетата* – *N-метилпирролидон* – *метанол* (1:1:2 *об/об/об*).

*Испытуемый раствор*. 20,0 мг испытуемого образца растворяют в 15 мл *N-метилпирролидона* и в течение не более чем 2 ч доводят смесью растворителей до объёма 50,0 мл. 5,0 мл полученного раствора доводят смесью растворителей до объёма 25,0 мл.

*Раствор сравнения (а).* 20,0 мг фармакопейного стандартного образца *амфотерицина B* растворяют в 15 мл *N-метилпирролидона* и в течение не более чем 2 ч доводят смесью растворителей до объёма 50,0 мл. 5,0 мл полученного раствора доводят смесью растворителей до объёма 25,0 мл.

*Раствор сравнения (б).* 1,0 мл раствора сравнения (а) доводят смесью растворителей до объёма 100,0 мл.

*Раствор сравнения (в).* 20,0 мг фармакопейного стандартного образца *нистатина* растворяют в 15 мл *N-метилпирролидона* и в течение не более чем 2 ч доводят смесью растворителей до объёма 50,0 мл. 5,0 мл этого раствора доводят смесью растворителей до объёма 25,0 мл. 2,0 мл полученного раствора доводят смесью растворителей до объёма 100,0 мл.

*Раствор сравнения (г).* Для получения примесей B и C, 10 мг испытуемого образца растворяют в 5 мл *N-метилпирролидона* и в течение не более чем 2 ч прибавляют 35 мл смеси 1 объёма метанола и 4 объёмов этанола. К полученной смеси прибавляют 0,10 мл *хлористоводородной кислоты разведённой 7,3 %*, перемешивают и выдерживают при 25 °С в течение 2,5 ч. К полученному раствору прибавляют 10 мл раствора 10 г/л *аммония ацетата* и перемешивают.

*Раствор сравнения (д).* 4 мг фармакопейного стандартного образца *амфотерицина B для идентификации пика*, содержащего примеси A и B растворяют в 5 мл *N-метилпирролидона* и в течение не более чем 2 ч доводят смесью растворителей до объёма 50 мл.

*Контрольный раствор.* Смесь растворителей.

Примечание

Примесь A (амфотерицин A): 28,29-дигидро-амфотерицин B.

Примесь B (амфотерицин X1): 13-*O*-метил-амфотерицин B.

Примесь C (амфотерицин X2): 13-*O*-этил-амфотерицин B.

*Условия хроматографирования:*

*- колонка:* длиной 0,15 м и внутренним диаметром 4,6 мм; заполненная с*иликагелем октадецилсилильным эндкепированным для хроматографии* с размером частиц 3 мкм;

*- температура колонки:* 20 °С;

- *подвижные фазы:*

*- подвижная фаза А:* смешивают 1 объём *метанола*, 3 объёма *ацетонитрила* и 6 объёмов раствора 4,2 г/л *лимонной кислоты*
(рН которого предварительно доводят аммиаком концентрированным до 4,7);

*- подвижная фаза Б:* смешивают 12 объёмов *метанола*, 20 объёмов раствора 4,2 г/л *лимонной кислоты* (рН которого предварительно доводят аммиаком концентрированным до 3,9) и 68 объёмов *ацетонитрила*;

*- режим градиентного элюирования:*

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Время****(мин)** | **Подвижная фаза А****(% *об/об*)** | **Подвижная фаза Б****(% *об/об*)** |
| 0–3 | 100 | 0 |
| 3–23 | 100→70 | 0→30 |
| 23–33 | 70→0 | 30→100 |
| 33–40 | 0 | 100 |

*- скорость подвижной фазы:* 0,8 мл/мин;

- *детектор:* спектрофотометрический; длина волны для тетраенов 303 нм и для гептаенов 383 нм;

- *вводимый объём пробы:* по 20 мкл испытуемого раствора и растворов сравнения (б), (в), (г) и (д).

*Идентификация примесей:* для идентификации пиков примесей A и B используют хроматограмму раствора сравнения (д) и хроматограмму, прилагаемую к фармакопейному стандартному образцу *амфотерицина B для идентификации пика*.

*Относительное время удерживания* (время удерживания амфотерицина B – около 16 мин)*:* примесь B – около 0,75; примесь A – около 0,8; нистатин – около 0,85.

*Пригодность хроматографической системы* *при 383 нм* (раствор сравнения (г)):

- *разрешение (R*S*):* не менее 1,5 между двумя пиками при относительном времени удерживания около 0,7.

*Пределы содержания примесей:*

- *примесь* *A при 303 нм:* не более чем в 2,5 раза больше площади основного пика на хроматограмме раствора сравнения (в) (5,0 %); при использовании субстанции в производстве лекарственных препаратов для парентерального применения: не более площади основного пика на хроматограмме раствора сравнения (в) (2,0 %);

*- любая другая примесь при 303 нм:* для каждой примеси не более чем в 0,5 раза больше площади основного пика на хроматограмме раствора сравнения (в) (1,0 %);

- *примесь* *B при 383 нм:* не более чем в 4 раза больше площади основного пика на хроматограмме раствора сравнения (б) (4,0 %);

*- любая другая примесь при 383 нм:* для каждой примеси не более чем в 2 раза больше площади основного пика на хроматограмме раствора сравнения (б) (2,0 %);

- *сумма примесей при 303 и 383 нм:* не более 15,0 %;

- *неучитываемый предел при 303 нм:* 0,05 от площади основного пика на хроматограмме раствора сравнения (в) (0,1 %);

- *неучитываемый предел при 383 нм:* 0,1 от площади основного пика на хроматограмме раствора сравнения (б) (0,1 %).

**Остаточные органические растворители** *(ОФС «Остаточные органические растворители»).*

**Потеря в массе при высушивании** *(ОФС «Потеря в массе при высушивании», способ 2).* Не более 5,0 %. 1,000 г испытуемого образца высушивают при давлении не более 0,7 кПа при температуре 60 °С.

**Сульфатная зола** *(ОФС «Сульфатная зола»).*Не более 3,0 %; при использовании субстанции в производстве лекарственных препаратов для парентерального применения: не более 0,5 %.

Определение проводят с использованием 1,0 г испытуемого образца.

**Микробиологическая чистота.** Испытуемый образец должен выдерживать требования испытания на микробиологическую чистоту.

Испытание проводят для нестерильных субстанций.

**Стерильность** *(ОФС «Стерильность»).* Испытуемый образец должен выдерживать требования испытания на стерильность.

Испытание проводят для стерильных субстанций.

**Бактериальные эндотоксины** *(ОФС «Бактериальные эндотоксины»).* Менее 1,0 МЕ/мг. Испытание проводят в случае, если субстанция предназначена для использования в производстве лекарственных препаратов для парентерального применения, без последующей процедуры удаления бактериальных эндотоксинов.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Микробиологический метод *(ОФС «Определение антимикробной активности антибиотиков»)* с использованием фармакопейного стандартного образца *амфотерицина B для микробиологического определения.*

*Растворы защищают от света в течение всего испытания.*

25,0 мг испытуемого образца растворяют в *диметилсульфоксиде* и, при постоянном перемешивании, доводят объём раствора тем же растворителем до 25,0 мл. Полученный раствор, при постоянном перемешивании, разбавляют *диметилсульфоксидом* до получения растворов с необходимыми концентрациями (были установлены следующие пригодные концентрации: 44,4, 66,7 и 100 МЕ/мл). Полученные растворы разбавляют 1:20 при помощи 0,2 М фосфатным буферным раствором рН 10,5 (27,22 г калия дигидрофосфата растворяют в 930,0 мл воды. Доводят рН до 10,5 потенциометрически с помощью 300 г/л раствора калия гидроксида и доводят объём раствора водой до 1000 мл.) таким образом, чтобы все растворы содержали 5 % (*об/об*) *диметилсульфоксида*. Испытуемые растворы и растворы сравнения готовят одновременно.

ХРАНЕНИЕ

В защищённом от света месте, при температуре от 2 °С до 8 °С в герметичной упаковке.

Если субстанция стерильная, её хранят в стерильной герметичной упаковке с контролем первого вскрытия.