

Nước

Không được quá 7,0 % (Phụ lục 10.3).

Tro sulfat

Không được quá 1,0 % (Phụ lục 9,9, phương pháp 2).

Sau khi tro hóa lần đầu, làm ẩm cần với 2 ml *acid nitric* (TT) và 5 giọt *acid sulfuric* (TT).

Nội độc tố vi khuẩn

Không được quá 2,00 EU/mg (Phụ lục 13.2).

Nếu chế phẩm dùng để sản xuất thuốc tiêm mà trong quy trình không có giai đoạn tiến hành loại bỏ nội độc tố vi khuẩn thì phải đáp ứng yêu cầu của phép thử này.

Định lượng

Phương pháp sắc ký lỏng (Phụ lục 5.3).

Pha động: Hòa tan 2,0 g *tris(hydroxymethyl)aminomethan* (TT) trong 800 ml nước. Thêm 20 ml dung dịch *acid sulfuric* 0,5 M (TT) vào dung dịch thu được và pha loãng thành 2000 ml bằng *acetonitril* (TT). Để nguội, lọc qua màng lọc 0,2 μ m. Điều chỉnh nếu cần.

Thuốc thử 2,4-dinitrofluorobenzen: Pha dung dịch 2,4-dinitrofluorobenzen (TT) có nồng độ 10 mg/ml trong *ethanol* 96 % (TT). Dung dịch dùng trong vòng 5 ngày sau khi pha, bảo quản trong tủ lạnh.

Thuốc thử tris(hydroxymethyl)aminomethan: Pha dung dịch gốc chứa *tris(hydroxymethyl)aminomethan* (TT) nồng độ 15 mg/ml trong nước. Dung dịch này dùng được trong vòng 1 tháng, bảo quản trong tủ lạnh. Lấy 40 ml dung dịch gốc vào bình định mức 200 ml, thêm *dimethyl sulfoxid* (TT) và trộn đều, thêm *dimethyl sulfoxid* (TT) đến vạch. Thuốc thử này dùng trong vòng 4 h. (Nếu nhúng chìm trong nước đá ở nhiệt độ dưới 10 °C thì có thể dùng thuốc thử này trong vòng 8 h).

Dung dịch thử: Hòa tan một lượng chế phẩm tương đương với 20 mg tobramycin trong nước và pha loãng thành 100 ml với cùng dung môi.

Dung dịch chuẩn gốc: Cân chính xác khoảng 55 mg tobramycin chuẩn vào bình định mức 50 ml, thêm 1 ml dung dịch *acid sulfuric* 0,5 M (TT) và một lượng nước để hòa tan tobramycin, sau đó thêm nước đến vạch.

Dung dịch chuẩn: Pha loãng dung dịch chuẩn gốc để thu được dung dịch có chứa 0,22 mg/ml tobramycin chuẩn trong nước.

Tạo dẫn xuất: [Chú ý: Làm nóng các dung dịch ở cùng nhiệt độ, cùng thời gian. Các bình được đặt vào và lấy ra khỏi bể cách thủy (được duy trì nhiệt độ ở 60 °C) đồng thời]. Lần lượt thêm vào 3 bình định mức dung tích 50 ml khác nhau 4,0 ml dung dịch chuẩn; 4,0 ml dung dịch thử và 4,0 ml nước. Thêm vào mỗi bình 10 ml thuốc thử 2,4-dinitrofluorobenzen và 10 ml thuốc thử tris(hydroxymethyl)aminomethan, lắc đều và đậy nắp bình. Để các bình vào bể cách thủy được duy trì ở (60 ± 2) °C trong (50 ± 5) min. Lấy bình ra, để yên 10 min. Thêm *acetonitril* (TT) đến gần vạch (cách vạch khoảng 2 ml), để nguội về nhiệt độ phòng và thêm

acetonitril (TT) đến vạch, lắc đều. Các dung dịch thu được sau khi tạo dẫn xuất lần lượt là các dung dịch dẫn xuất chuẩn, dung dịch dẫn xuất thử và dung dịch mẫu trắng.

Dung dịch phân giải: Chuẩn bị dung dịch mới pha *p-naphtholbenzein* (TT) có nồng độ 0,24 mg/ml trong *acetonitril* (TT). Pha loãng 2 ml dung dịch thu được thành 10 ml bằng dung dịch dẫn xuất chuẩn và sử dụng ngay.

Điều kiện sắc ký:

Cột kích thước (30 cm $\times$ 3,9 mm) được nhồi pha tĩnh C.

Detector quang phổ tử ngoại đặt ở bước sóng 365 nm.

Tốc độ dòng: 1,2 ml/min.

Thể tích tiêm: 20 μ l.

Cách tiến hành:

Tiến hành sắc ký dung dịch mẫu trắng, dung dịch phân giải, dung dịch dẫn xuất chuẩn và thử.

Dùng dung dịch mẫu trắng để xác định pic dung môi và pic thuốc thử.

Kiểm tra tính phù hợp của hệ thống: Trên sắc ký đồ của dung dịch phân giải, thời gian lưu tương đối của pic *p-naphtholbenzein* so với pic tobramycin khoảng 0,6. Độ phân giải giữa pic *p-naphtholbenzein* và pic tobramycin ít nhất là 4,0. Trên sắc ký đồ của dung dịch dẫn xuất chuẩn, độ lệch chuẩn tương đối của diện tích pic tobramycin thu được từ 6 lần tiêm lặp lại không lớn hơn 2,0 %.

Tính hàm lượng tobramycin, $C_{18}H_{37}N_5O_9$, trong chế phẩm dựa vào diện tích pic thu được từ dung dịch dẫn xuất chuẩn, dung dịch dẫn xuất thử và hàm lượng của $C_{18}H_{37}N_5O_9$ trong tobramycin chuẩn.

Bảo quản

Trong đồ đựng kín.

Loại thuốc

Kháng sinh nhóm aminoglycosid.

Chế phẩm

Thuốc tiêm, thuốc nhỏ mắt.

THUỐC NHỎ MẮT TOBRAMYCIN

Thuốc nhỏ mắt tobramycin là dung dịch vô khuẩn của tobramycin hoặc tobramycin sulfat trong nước, có thể có thêm các tá dược thích hợp như chất đệm, chất bảo quản, chất phân tán hay chất điều chỉnh độ đẳng trương.

Chế phẩm phải đáp ứng các yêu cầu trong chuyên luận "Thuốc dùng tại mắt" (Phụ lục 1.14) và các yêu cầu sau đây:

Hàm lượng tobramycin, $C_{18}H_{37}N_5O_9$, từ 90,0 % đến 120,0 % so với lượng ghi trên nhãn.

Tính chất

Dung dịch trong, không màu.

Định tính

A. Phương pháp sắc ký lớp mỏng (Phụ lục 5.4).

Bản mỏng: *Silica gel G*.

Dung môi khai triển: *Methanol - cloroform - amoniac đậm đặc* (60 : 25 : 30).

Dung dịch thử: Pha loãng một thể tích thích hợp thuốc nhỏ mắt với nước nếu cần để thu được dung dịch có nồng độ tobramycin 3 mg/ml.

Dung dịch đối chiếu (1): Là dung dịch tobramycin chuẩn trong nước có nồng độ 3 mg/ml.

Dung dịch đối chiếu (2): Hỗn hợp đồng thể tích của dung dịch thử và dung dịch đối chiếu (1).

Cách tiến hành:

Chấm riêng biệt 5 μ l mỗi dung dịch trên lên bản mỏng. Triển khai sắc ký đến khi dung môi đi được khoảng 3/4 chiều dài bản mỏng. Lấy bản mỏng ra, để dung môi bay hơi và sấy bản mỏng ở 105 °C trong 15 min. Ngay lập tức phun dung dịch *ninhydrin* (TT) 1 % trong hỗn hợp dung môi *1-butanol - pyridin* (100 : 1).

Vết chính trên sắc ký đồ của dung dịch thử phải tương ứng về vị trí, màu sắc và kích thước so với vết chính trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu (1). Dung dịch đối chiếu (2) chỉ cho một vết duy nhất có vị trí tương ứng với vết chính trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu (1).

B. Trong phần Định lượng, thời gian lưu của pic chính trên sắc ký đồ của dung dịch dẫn xuất thử phải tương ứng với thời gian lưu của pic chính trên sắc ký đồ của dung dịch dẫn xuất chuẩn.

pH

Từ 7,0 đến 8,0 (Phụ lục 6.2).

Định lượng

Phương pháp sắc ký lỏng (Phụ lục 5.3).

Pha động: Hòa tan 2,0 g *tris(hydroxymethyl)aminomethan* (TT) trong 800 ml nước. Thêm 20 ml dung dịch *acid sulfuric* 0,5 M (TT) vào dung dịch thu được và pha loãng thành 2000 ml bằng *acetonitril* (TT). Để nguội, lọc qua màng lọc 0,2 μ m. Điều chỉnh tỷ lệ dung môi nếu cần.

Thuốc thử 2,4-dinitrofluorobenzen: Pha dung dịch 2,4-dinitrofluorobenzen (TT) có nồng độ 10 mg/ml trong *ethanol* 96 % (TT). Dung dịch được dùng trong vòng 5 ngày sau khi pha, bảo quản trong tủ lạnh ở nhiệt độ từ 2 °C đến 8 °C.

Thuốc thử tris(hydroxymethyl)aminomethan: Pha dung dịch gốc chứa *tris(hydroxymethyl)aminomethan* (TT) nồng độ 15 mg/ml trong nước. Dung dịch này dùng được trong vòng 1 tháng, bảo quản trong tủ lạnh ở nhiệt độ từ 2 °C đến 8 °C. Lấy 40 ml dung dịch gốc vào bình định mức 200 ml, thêm *dimethyl sulfoxid* (TT) và trộn đều, thêm *dimethyl sulfoxid* (TT) đến vạch.

Thuốc thử này được dùng trong vòng 4 h. (Nếu để trong nước đá ở nhiệt độ dưới 10 °C thì có thể dùng thuốc thử này trong vòng 8 h).

Dung dịch thử: Hút chính xác một lượng thể tích chế phẩm, pha loãng với nước để thu được dung dịch có nồng độ tobramycin khoảng 0,22 mg/ml.

Dung dịch chuẩn: Cân chính xác khoảng 44 mg tobramycin chuẩn vào bình định mức 50 ml, thêm 1 ml dung dịch *acid sulfuric* 0,5 M (TT) và thêm nước để hòa tan chế phẩm, sau đó thêm nước đến vạch. Pha loãng 5,0 ml dung dịch thu được thành 20 ml bằng nước.

Tạo dẫn xuất: [Chú ý: Làm nóng các dung dịch ở cùng nhiệt độ, cùng thời gian. Các bình được đặt vào, lấy ra khỏi bể cách thủy (được duy trì ở nhiệt độ 60 °C) đồng thời]. Lần lượt thêm vào 3 bình định mức dung tích 50 ml khác nhau 4,0 ml dung dịch chuẩn; 4,0 ml dung dịch thử và 4,0 ml nước. Thêm vào mỗi bình 10 ml thuốc thử 2,4-dinitrofluorobenzen và 10 ml thuốc thử *tris(hydroxymethyl)aminomethan*, lắc đều và đậy nắp bình. Để các bình vào bể cách thủy được duy trì ở 60 °C $\pm$ 2 °C trong 50 min $\pm$ 5 min. Lấy bình ra, để yên 10 min. Thêm *acetonitril* (TT) đến gần vạch (cách vạch khoảng 2 ml), để nguội về nhiệt độ phòng và thêm *acetonitril* (TT) đến vạch, lắc đều. Các dung dịch thu được sau khi tạo dẫn xuất lần lượt là dung dịch dẫn xuất chuẩn, dung dịch dẫn xuất thử và dung dịch mẫu trắng.

Dung dịch phân giải: Chuẩn bị dung dịch mới pha *p-naphtholbenzein* (TT) có nồng độ 0,24 mg/ml trong *acetonitril* (TT). Pha loãng 2 ml dung dịch thu được thành 10 ml bằng dung dịch dẫn xuất chuẩn và sử dụng ngay.

Điều kiện sắc ký:

Cột kích thước (25 cm $\times$ 4,6 mm) được nhồi pha tĩnh C (5 μ m).

Detector quang phổ tử ngoại đặt ở bước sóng 365 nm.

Tốc độ dòng: 1,2 ml/min.

Thể tích tiêm: 20 μ l.

Cách tiến hành:

Tiến hành sắc ký với dung dịch mẫu trắng để xác định pic dung môi và thuốc thử.

Kiểm tra tính phù hợp của hệ thống: Trên sắc ký đồ của dung dịch phân giải, thời gian lưu tương đối của pic *p-naphtholbenzein* so với pic tobramycin khoảng 0,6; độ phân giải giữa pic *p-naphtholbenzein* và pic tobramycin ít nhất là 4,0. Trên sắc ký đồ của dung dịch dẫn xuất chuẩn, độ lệch chuẩn tương đối của diện tích pic thu được từ 6 lần tiêm lặp lại không lớn hơn 2,0 %.

Tiến hành sắc ký với dung dịch dẫn xuất thử và dung dịch dẫn xuất chuẩn.

Tính hàm lượng tobramycin, $C_{18}H_{37}N_5O_9$, trong chế phẩm dựa vào diện tích pic thu được trên sắc ký đồ của dung dịch dẫn xuất chuẩn, dung dịch dẫn xuất thử và hàm lượng $C_{18}H_{37}N_5O_9$ của tobramycin chuẩn.

Bảo quản

Trong đồ đựng kín, ở nơi mát, tránh ánh sáng.

Loại thuốc

Kháng sinh.

Hàm lượng thường dùng

Dung dịch 0,3 %.