

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 đáp ứng thu được từ 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

Nếu chế phẩm vô khuẩn, phải bảo quản trong bao bì kín, vô khuẩn.

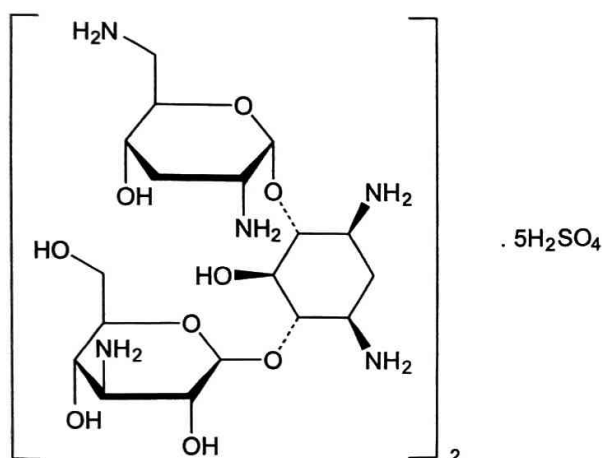
Loại thuốc

Kháng sinh nhóm aminoglycosid.

Chế phẩm

Thuốc tiêm, thuốc nhỏ mắt.

TOBRAMYCIN SULFAT



$(C_{18}H_{37}N_5O_9)_2 \cdot 5H_2SO_4$

P.t.l: 1425,42

Tobramycin sulfat là 4-O-(3-amino-3-deoxy- α -D-glucopyranosyl)-2-deoxy-6-O-(2,6-diamino-2,3,6-trideoxy- α -D-ribo-hexopyranosyl)-L-streptamin sulfat, được điều chế từ *Streptomyces tenebrarius* hoặc các phương pháp khác, phải chứa từ 634 μ g/mg đến 739 μ g/mg tobramycin ($C_{18}H_{37}N_5O_9$).

Tính chất

Bột màu trắng hoặc gần như trắng, tan trong nước.

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 (60 : 25 : 30).

Dung dịch thử: Hòa tan chế phẩm trong nước để thu được dung dịch nồng độ tobramycin 6 mg/ml.

Dung dịch đối chiếu (1): Dung dịch chứa 6 mg/ml tobramycin chuẩn trong nước.

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 rẽ lên bản mỏng 3 μ l mỗi

dung dịch trên. 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 110 °C trong 15 min. Ngay lập tức phun dung dịch ninhydrin (TT) 10 mg/ml trong hỗn hợp dung môi butanol - pyridin (100 : 1).

Vết tobramycin thu được có màu hồng. Vết chính trên sắc ký đồ của dung dịch thử phải tương ứng về vị trí 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, pic chính thu được trên sắc ký đồ của dung dịch dẫn xuất thử phải có thời gian lưu tương ứng với pic chính thu được trên sắc ký đồ của dung dịch dẫn xuất chuẩn.

C. Chế phẩm phải cho phản ứng của ion sulfat (Phụ lục 8.1).

pH

pH của dung dịch 4,0 % phải từ 6,0 đến 8,0 (Phụ lục 6.2).

Tạp chất liên quan

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

Bản mỏng: Silica gel G.

Dung môi khai triển: Dung dịch natri clorid 29,2 % - ethanol 96 % - nước (50 : 30 : 20).

Dung dịch hypoclorit loãng: Pha loãng 20 ml dung dịch natri hypoclorit (TT) thành 100 ml bằng nước.

Thuốc thử tinh bột - kali iodid: Hòa tan 1,1 g kali iodid (TT) trong 60 ml nước, đun sôi trong 15 min, thêm từ từ hỗn dịch của 1,5 g tinh bột (TT) trong 10 ml nước. Thêm 25 ml nước và đun sôi trong 10 min. Để nguội và pha loãng thành 100 ml bằng nước.

Dung dịch thử: Chuyển 50 mg chế phẩm vào bình định mức 10 ml, thêm 7 ml nước để hòa tan và điều chỉnh đến pH 5,5 $\pm$ 0,4 bằng dung dịch acid sulfuric 0,5 M (TT). Thêm nước đến vạch, trộn đều.

Dung dịch đối chiếu: Pha loãng dung dịch thử bằng nước để thu được dung dịch có nồng độ tobramycin sulfat 0,05 mg/ml.

Cách tiến hành: Chấm riêng biệt 1 μ l các dung dịch trên lên bản mỏng. Triển khai sắc ký đến khi dung môi đi được khoảng 15 cm. Lấy bản mỏng ra, để dung môi bay hơi dưới luồng không khí nóng và sấy bản mỏng ở 110 °C trong 10 min. Phun lên bản mỏng đang nóng dung dịch hypoclorit loãng. Làm khô bản mỏng bằng luồng không khí lạnh đến khi phần bản mỏng đã phun ở dưới vạch chấm chỉ cho màu xanh lam nhạt khi nhỏ một giọt thuốc thử tinh bột - kali iodid.

Tiếp tục phun bản mỏng bằng thuốc thử tinh bột - kali iodid, các vết có màu đỏ tím hơi xanh xuất hiện ngay. Bắt kỳ vết phụ nào trên sắc ký đồ thu được từ dung dịch thử không được có màu đậm hơn màu của vết chính trên sắc ký đồ thu được từ dung dịch đối chiếu (1,0 %).

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 cẩn 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).