

Hút 1 ml dịch lọc pha loãng thành 100 ml bằng *methanol* (TT). Phổ hấp thụ (Phụ lục 4.1) của dung dịch thu được ở dải sóng từ 220 nm đến 350 nm có cực đại hấp thụ tại bước sóng 232 nm.

B. Hòa một lượng bột viên đã nghiền mịn tương ứng với khoảng 2.000.000 IU spiramycin trong 10 ml *dung dịch acid sulfuric 0,05 M* (TT), thêm 25 ml *nước*, lắc đều và lọc. Điều chỉnh dịch lọc đến pH 8 bằng *dung dịch natri hydroxyd 0,1 M* (TT) và pha loãng với *nước* thành 50 ml. Thêm vào 5 ml dung dịch này 2 ml hỗn hợp *nước - acid sulfuric* (1 : 2), xuất hiện màu nâu.

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

Bản mỏng: Silica gel G.

Dung môi khai triển: Isopropanol - dung dịch amoni acetat 15 % đã điều chỉnh về pH 9,6 bằng dung dịch natri hydroxyd 40 % - ethyl acetat (4 : 8 : 9). Trộn đều hỗn hợp, để yên tách lớp và sử dụng lớp trên.

Dung dịch thử: Lắc một lượng bột viên tương ứng với 160.000 IU spiramycin với 10 ml methanol (TT), lọc.

Dung dịch đối chiếu (1): Dung dịch 0,4 % spiramycin chuẩn trong methanol (TT).

Dung dịch đối chiếu (2): Dung dịch 0,4 % erythromycin A chuẩn trong methanol (TT).

Cách tiến hành:

Châm riêng biệt lên bản mỏng 5 µl mỗi dung dịch trên. Triển khai sắc ký đến khi dung môi đi được 15 cm. Lấy bản mỏng ra, để khô tự nhiên ở nhiệt độ phòng. Sau đó phun lên bản mỏng *dung dịch anisaldehyd trong ethanol* (TT), sấy bản mỏng ở 110 °C trong 5 min.

Vết chính trên sắc ký đồ của dung dịch thử phải tương ứng với vết chính trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu (1) về vị trí, màu sắc, kích thước và phải khác với vết chính trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu (2).

Định lượng

Cân 20 viên, tính khối lượng trung bình của viên, nghiền thành bột mịn. Cân chính xác một lượng bột viên tương ứng với 400.000 IU spiramycin vào bình định mức 100 ml, thêm 50 ml *methanol* (TT), lắc siêu âm 15 min, để nguội đến nhiệt độ phòng, thêm *methanol* (TT) vừa đủ đến vạch, lắc đều, ly tâm lấy dịch trong.

Tiến hành định lượng theo chuyên luận "Xác định hoạt lực kháng sinh bằng phương pháp thử vi sinh vật" (Phụ lục 13.9).

Bảo quản

Trong bao bì kín, bảo quản nơi thoáng mát, tránh ánh sáng.

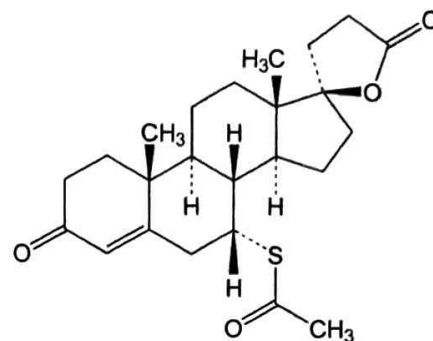
Loại thuốc

Thuốc kháng sinh.

Hàm lượng thường dùng

375.000 IU; 1.500.000 IU; 3.000.000 IU.

SPIRONOLACTON



$C_{24}H_{32}O_4S$

P.t.l: 416,6

Spironolacton là (2'R)-7α-(acetylsulfany)-3',4'-dihydro-5'H-spiro[androst-4-en-17,2'-furan]-3,5'-dion phải chứa từ 97,5 % đến 102,0 % $C_{24}H_{32}O_4S$, tính theo chế phẩm đã làm khô.

Tính chất

Bột đa hình màu trắng hay màu trắng hơi vàng. Thực tế không tan trong nước, tan trong ethanol 96 %.

Định tính

Có thể chọn một trong hai nhóm định tính sau:

Nhóm I: A.

Nhóm II: B, C.

A. Phổ hấp thụ hồng ngoại (Phụ lục 4.2) của chế phẩm phải phù hợp với phổ hấp thụ hồng ngoại của spironolacton chuẩn. Nếu phổ hồng ngoại ở trạng thái rắn của mẫu thử và chuẩn khác nhau thì hòa tan riêng rẽ chế phẩm và chuẩn trong một thể tích tối thiểu *methanol* (TT), bốc hơi tới gần rồi tiến hành ghi lại phổ mới của cần.

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

Bản mỏng: Silica gel F₂₅₄.

Dung môi khai triển: Nước - cyclohexan - ethyl acetat (1 : 24 : 75).

Dung dịch thử: Hòa tan 20 mg chế phẩm trong methylen clorid (TT) và pha loãng thành 10 ml với cùng dung môi.

Dung dịch đối chiếu: Hòa tan 20 mg spironolacton chuẩn trong methylen clorid (TT) và pha loãng thành 10 ml với cùng dung môi.

Cách tiến hành: Châm riêng biệt lên bản mỏng 5 µl mỗi dung dịch trên. Triển khai sắc ký tới khi dung môi đi được 3/4 chiều dài bản mỏng. Để khô bản mỏng ngoài không khí và quan sát dưới ánh sáng tử ngoại ở bước sóng 254 nm. Vết chính trên sắc ký đồ của dung dịch thử phải tương ứng về vị trí và kích thước với vết chính trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu.

C. Thêm 2 ml dung dịch *acid sulfuric* (TT) 50 % (tt/tt) vào 10 mg chế phẩm và lắc, thu được dung dịch có màu cam với huỳnh quang xanh lục ánh vàng rõ. Đun nóng nhẹ dung dịch, màu chuyển thành đỏ đậm và khí hydro sulfid bay lên làm đen *giấy tẩm chì acetat* (TT). Thêm 10 ml *nước*, dung dịch chuyển màu vàng lục và vẫn đục hoặc xuất hiện tủa.

Góc quay cực riêng

Từ -41° đến -46° , tính theo chế phẩm đã làm khô (Phụ lục 6.4).

Hòa tan 0,100 g chế phẩm trong *ethanol* 96 % (TT) và pha loãng thành 10,0 ml với cùng dung môi.

Tạp chất liên quan

Phương pháp sắc ký lỏng (Phụ lục 5.3). Chuẩn bị các dung dịch ngay trước khi dùng.

Pha động: *Acetonitril* - *tetrahydrofuran* - *methanol* (TT) - *nước* (15 : 20 : 425 : 540).

Hỗn hợp dung môi: *Acetonitril* - *nước* (50 : 50).

Dung dịch thử (1): Hòa tan 50,0 mg chế phẩm trong 2,5 ml *tetrahydrofuran* (TT) và pha loãng thành 25,0 ml bằng hỗn hợp dung môi.

Dung dịch thử (2): Pha loãng 1,0 ml dung dịch thử (1) thành 100,0 ml bằng hỗn hợp dung môi.

Dung dịch đối chiếu (1): Pha loãng 1,0 ml dung dịch thử (2) thành 10,0 ml bằng hỗn hợp dung môi.

Dung dịch đối chiếu (2): Hòa tan 15 mg spironolacton chuẩn dùng để kiểm tra tính phù hợp của hệ thống (chứa các tạp chất A, C, D, E và I) trong 1,0 ml hỗn hợp dung môi.

Dung dịch đối chiếu (3): Hòa tan 50,0 mg spironolacton chuẩn trong 2,5 ml *tetrahydrofuran* (TT) và pha loãng thành 25,0 ml bằng hỗn hợp dung môi. Pha loãng 1,0 ml dung dịch thu được thành 100,0 ml bằng hỗn hợp dung môi.

Dung dịch đối chiếu (4): Hòa tan 5,0 mg canrenon chuẩn (tạp chất F) trong 2,5 ml *tetrahydrofuran* (TT) và pha loãng thành 25,0 ml bằng hỗn hợp dung môi. Pha loãng 3,0 ml dung dịch thu được thành 100,0 ml bằng hỗn hợp dung môi.

Điều kiện sắc ký:

Cột kích thước (15 cm $\times$ 4,6 mm) được nhồi pha tĩnh *end-capped octadecylsilyl silica gel* dùng cho sắc ký (3 μ m).

Nhiệt độ cột: 40 $^{\circ}$ C.

Detector quang phổ tử ngoại đặt ở bước sóng 254 nm.

Tốc độ dòng: 1,0 ml/min.

Thể tích tiêm: 20 μ l.

Cách tiến hành:

Tiến hành sắc ký với dung dịch thử (1), dung dịch đối chiếu (1), (2) và (4).

Tiến hành sắc ký với thời gian gấp 2,5 lần thời gian lưu của spironolacton.

Sử dụng sắc ký đồ cung cấp kèm theo spironolacton chuẩn dùng để kiểm tra tính phù hợp của hệ thống và sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu (2) để xác định pic của tạp chất A, C, D, E và I. Sử dụng sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu (4) để xác định pic của tạp chất F.

Thời gian lưu tương đối so với spironolacton (thời gian lưu khoảng 26 min): Tạp chất A khoảng 0,95; tạp chất F khoảng 1,2; tạp chất C khoảng 1,5; tạp chất D khoảng 1,6; tạp chất E khoảng 1,7; tạp chất I khoảng 1,9.

Kiểm tra tính phù hợp của hệ thống: Trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu (2), tỷ số đỉnh - hõm (H_p/H_v) ít nhất là 1,5; trong đó H_p là chiều cao đỉnh pic tạp chất A so với đường nền và H_v là chiều cao tính từ đường nền lên đến

đáy hõm phân tách giữa pic tạp chất A và pic spironolacton. Để tính hàm lượng, nhân diện tích pic tạp chất F với hệ số hiệu chỉnh là 2,3.

Giới hạn:

Tạp chất I: Diện tích pic tạp chất I không được lớn hơn 5 lần diện tích pic chính thu được trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu (1) (0,5 %).

Tạp chất E, F: Với mỗi tạp chất, diện tích pic đã hiệu chỉnh, nếu cần, không được lớn hơn 3 lần diện tích pic chính thu được trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu (1) (0,3 %).

Tạp chất A, C: Với mỗi tạp chất, diện tích pic không được lớn hơn 2 lần diện tích pic chính thu được trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu (1) (0,2 %).

Tạp chất D: Diện tích pic tạp chất D không được lớn hơn 1,5 lần diện tích pic chính thu được trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu (1) (0,15 %).

Tạp chất khác: Với mỗi tạp chất, diện tích pic không được lớn hơn diện tích pic chính trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu (1) (0,10 %).

Tổng diện tích pic của tất cả các tạp chất không được lớn hơn 7 lần diện tích pic chính thu được trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu (1) (0,7 %).

Bỏ qua những pic có diện tích nhỏ hơn hoặc bằng 0,5 lần diện tích pic chính thu được trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu (1) (0,05 %).

Ghi chú:

Tạp chất A: (2'R)-7 α -(acetylsulfanyl)-5'H-spiro[androst-4-en-17,2'-furan]-3,5'-dion (Δ 20-spironolacton).

Tạp chất B: (2'R)-7 α -(acetylsulfanyl)-4-bromo-3',4'-dihydro-5'H-spiro[androst-4-en-17,2'-furan]-3,5'-dion (4-bromospironolacton).

Tạp chất C: (2'R)-3',4'-dihydro-5'H-spiro[androst-4-en-17,2'-furan]-3,5'-dion (aldon).

Tạp chất D: (2'R)-7 α -(acetyldisulfanyl)-3',4'-dihydro-5'H-spiro[androst-4-en-17,2'-furan]-3,5'-dion (disulfanyl-spironolacton).

Tạp chất E: (2'R)-7 β -(acetylsulfanyl)-3',4'-dihydro-5'H-spiro[androst-4-en-17,2'-furan]-3,5'-dion (7 β -spironolacton).

Tạp chất F: (2'R)-3',4'-dihydro-5'H-spiro[androst-4,6-dien-17,2'-furan]-3,5'-dion (canrenon).

Tạp chất G: (2'R)-7 α -(acetylsulfanyl)-6 β -hydroxy-3',4'-dihydro-5'H-spiro[androst-4-en-17,2'-furan]-3,5'-dion (6 β -hydroxy-spironolacton).

Tạp chất H: (2'S)-spiro[androst-4,6-dien-17,2'-oxiran]-3-on.

Tạp chất I: S-[17 α -(ethoxymethyl)-17-hydroxy-3-oxoandrost-4-en-7 α -yl] ethanethioat.

Hợp chất thiol tự do

Thêm 20 ml *nước* vào 2,0 g chế phẩm, lắc trong 1 min và lọc. Lấy 10 ml dịch lọc, thêm 0,05 ml *dung dịch iot* 0,05 M (TT) và 0,1 ml *dung dịch hồ tinh bột* (TT) và trộn đều. Màu xanh lam xuất hiện.

Crom

Không được quá 50 phần triệu.

Lấy 0,20 g chế phẩm vào chén nung platin, thêm 1 g *kali carbonat* (TT) và 0,3 g *kali nitrat* (TT). Đun nóng nhẹ đến

khi hỗn hợp chảy ra và tiếp tục nung ở 600 °C đến 650 °C đến khi cháy hết carbon. Để nguội, hòa tan hoàn toàn cặn trong 10 ml nước bằng cách đun nóng nhẹ, lọc và pha loãng thành 20 ml bằng nước. Lấy 10 ml dung dịch thu được, thêm 0,5 g ure (TT) và thêm dung dịch acid sulfuric (TT) 14 % (tt/tt) đến khi dung dịch có tính acid. Khi hết sủi bọt, thêm 1 ml dung dịch acid sulfuric (TT) 14 % (tt/tt), pha loãng thành 20 ml bằng nước và thêm 0,5 ml dung dịch diphenylcarbазid (TT).

Dung dịch không được có màu đậm hơn màu dung dịch chuẩn được chuẩn bị như sau: Thêm 1 ml dung dịch acid sulfuric (TT) 14 % (tt/tt) vào 0,50 ml dung dịch kali dicromat (TT) 28,3 mg/l mới pha, pha loãng thành 20 ml bằng nước và thêm 0,5 ml dung dịch diphenylcarbазid (TT).

Mất khối lượng do làm khô

Không được quá 0,5 % (Phụ lục 9.6).
(1,000 g; 105 °C; 3 h).

Tro sulfat

Không được quá 0,1 % (Phụ lục 9.9, phương pháp 2).
Dùng 1,0 g chế phẩm.

Định lượng

Phương pháp sắc ký lỏng (Phụ lục 5.3). Điều kiện sắc ký như mô tả trong phần Tạp chất liên quan.

Tiến hành sắc ký với dung dịch thử (2), dung dịch đối chiếu (3).

Tính hàm lượng phần trăm của spironolacton, $C_{24}H_{32}O_4S$ trong chế phẩm dựa vào diện tích pic thu được trên sắc ký đồ của dung dịch thử (2), dung dịch đối chiếu (3) và hàm lượng của $C_{24}H_{32}O_4S$ trong spironolacton chuẩn.

Bảo quản

Trong đồ đựng kín, tránh ánh sáng.

Loại thuốc

Thuốc lợi tiểu kháng aldosteron.

Chế phẩm

Viên nén.

VIÊN NÉN SPIRONOLACTON

Là viên nén chứa spironolacton.

Chế phẩm phải đáp ứng các yêu cầu trong chuyên luận “Thuốc viên nén” (Phụ lục 1.20) và các yêu cầu sau đây:

Hàm lượng spironolacton, $C_{24}H_{32}O_4S$, từ 95,0 % đến 105,0 % so với lượng ghi trên nhãn.

Định tính

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

Bản mỏng: Silica gel GF₂₅₄.

Dung môi khai triển: Cloroform - ethyl acetat - methanol (20 : 20 : 10).

Dung dịch thử: Cân chính xác một lượng bột viên tương ứng với khoảng 200 mg spironolacton vào bình định mức 50 ml. Hòa tan bằng methanol (TT), pha loãng đến vạch với cùng dung môi, lọc.

Dung dịch đối chiếu: Dung dịch chứa 4 mg/ml spironolacton chuẩn trong methanol (TT).

Cách tiến hành: Chấm riêng biệt lên bản mỏng 10 µl mỗi dung dịch trên. Triển khai sắc ký tới khi dung môi đi được 3/4 chiều dài bản mỏng. Để khô bản mỏng ngoài không khí và quan sát dưới ánh sáng tử ngoại ở bước sóng 254 nm. Vết chính trên sắc ký đồ của dung dịch thử phải có R_f giống với R_f của vết chính trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu.

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

Độ hòa tan (Phụ lục 11.4)

Thiết bị: Kiểu cánh khuấy.

Môi trường hòa tan: 1000 ml dung dịch acid hydrochloric 0,1 M (TT) có chứa 0,1 % natri lauryl sulfat (TT).

Tốc độ quay: 75 r/min.

Thời gian: 60 min.

Cách tiến hành:

Dung dịch thử: Sau thời gian hòa tan quy định lấy một phần dịch hòa tan và lọc, bỏ 20 ml dịch lọc đầu. Pha loãng dịch lọc (nếu cần) bằng môi trường hòa tan để thu được dung dịch có nồng độ spironolacton tương đương với dung dịch chuẩn.

Dung dịch chuẩn: Hòa tan spironolacton chuẩn trong một lượng nhỏ ethanol 96 % (TT), sau đó pha loãng bằng môi trường hòa tan (lượng ethanol không được lớn hơn tổng 1 % thể tích pha) để thu được dung dịch có nồng độ spironolacton khoảng 0,0125 mg/ml.

Đo độ hấp thụ (Phụ lục 4.1) của dung dịch chuẩn và dung dịch thử ở bước sóng 242 nm.

Tính lượng spironolacton, $C_{24}H_{32}O_4S$, đã hòa tan trong một viên dựa vào độ hấp thụ của dung dịch chuẩn, dung dịch thử và hàm lượng $C_{24}H_{32}O_4S$ của spironolacton chuẩn.

Yêu cầu: Không ít hơn 75 % (Q) lượng spironolacton, $C_{24}H_{32}O_4S$, so với lượng ghi trên nhãn được hòa tan trong 60 min.

Định lượng

Phương pháp sắc ký lỏng (Phụ lục 5.3).

Pha động: Methanol - nước (3 : 2).

Dung môi pha mẫu: Acetonitril - nước (1 : 1).

Dung dịch thử gốc: Cân ít nhất 10 viên vào bình định mức có thể tích thích hợp để được dung dịch có nồng độ spironolacton cuối cùng khoảng 1 mg/ml. Thêm dung môi pha mẫu và lắc 30 min, siêu âm 30 min hoặc đến khi viên rã hoàn toàn. Để nguội dung dịch về nhiệt độ phòng, dung môi pha mẫu đến vạch, lắc đều, ly tâm lấy dịch trong.

Dung dịch thử: Pha loãng dung dịch thử gốc bằng hỗn hợp dung môi để thu được dung dịch chứa spironolacton 0,5 mg/ml.