

Hỗn dịch tạo thành sau khi pha theo hướng dẫn trên nhãn thuốc phải đáp ứng các yêu cầu trong chuyên luận “Hỗn dịch thuốc” (Phụ lục 1.5).

Bột pha hỗn dịch phải đáp ứng các yêu cầu trong chuyên luận “Thuốc bột” (Phụ lục 1.7) và các yêu cầu sau đây:

Hàm lượng azithromycin, $C_{38}H_{72}N_2O_{12}$, từ 90,0 % đến 110,0 % so với lượng ghi trên nhãn.

Tính chất

Bột khô to, không bị ẩm, không vón, màu sắc đồng nhất.

Định tính

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

Nước

Không được quá 1,5 % (Phụ lục 10.3).

Dùng 0,5 g chế phẩm.

Định lượng

Phương pháp sắc ký lỏng (Phụ lục 5.3).

Pha động: Methanol - nước - amoniac (80 : 19,9 : 0,1).

Dung dịch chuẩn: Hòa tan một lượng azithromycin chuẩn trong pha động để thu được dung dịch có nồng độ azithromycin khoảng 1,0 mg trong 1 ml.

Dung dịch thử: Cân chính xác một lượng bột thuốc (thu được từ phép thử Đồng đề khối lượng) tương ứng với khoảng 50 mg azithromycin vào bình định mức 50 ml, thêm 30 ml pha động và lắc siêu âm 15 min. Pha loãng bằng pha động vừa đủ đến vạch, lắc đều, lọc.

Điều kiện sắc ký:

Cột kích thước (25 cm × 4,6 mm) được nhồi pha tĩnh B (5 μm).

Detector quang phổ tử ngoại đặt ở bước sóng 215 nm.

Tốc độ dòng: 1,5 ml/min.

Thể tích tiêm: 20 μl.

Cách tiến hành:

Tiến hành sắc ký lần lượt đối với dung dịch chuẩn và dung dịch thử.

Tính hàm lượng azithromycin, $C_{38}H_{72}N_2O_{12}$, có trong một đơn vị chế phẩm dựa vào diện tích pic của azithromycin thu được từ sắc ký đồ của dung dịch thử, dung dịch chuẩn và hàm lượng $C_{38}H_{72}N_2O_{12}$ trong azithromycin chuẩn.

Bảo quản

Trong gói giấy nhôm hoặc polyethylen kín.

Để nơi khô mát, tránh ánh sáng.

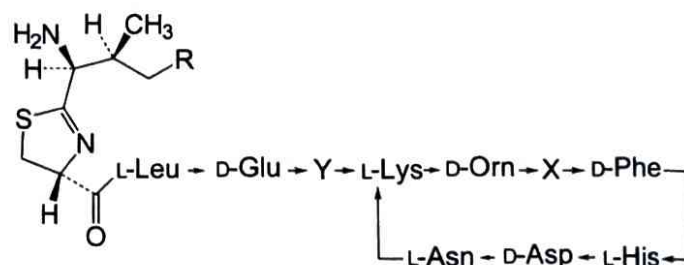
Loại thuốc

Thuốc kháng sinh.

Hàm lượng thường dùng

125 mg; 250 mg.

BACITRACIN



Tên	Công Thức	X	Y	R
Bacitracin A	$C_{66}H_{103}N_{17}O_{16}S$	L-Ile	L-Ile	CH_3
Bacitracin B ₁	$C_{65}H_{101}N_{17}O_{16}S$	L-Ile	L-Ile	H
Bacitracin B ₂	$C_{65}H_{101}N_{17}O_{16}S$	L-Val	L-Ile	CH_3
Bacitracin B ₃	$C_{65}H_{101}N_{17}O_{16}S$	L-Ile	L-Val	CH_3

Bacitracin là hỗn hợp các polypeptid kháng khuẩn được tạo ra bởi một số loài *Bacillus licheniformis* hoặc *Bacillus subtilis*, thành phần chủ yếu là bacitracin A, B₁, B₂ và B₃. Phải chứa ít nhất 60 IU/mg, tính theo chế phẩm đã làm khô.

Tính chất

Bột trắng hoặc gần như trắng. Hút ẩm. Dễ tan trong nước và trong ethanol 96 %.

Định tính

Có thể chọn một trong hai nhóm định tính sau:

Nhóm I: B, C.

Nhóm II: A, C.

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

Bản mỏng: Silica gel G.

Dung môi khai triển: Acid acetic băng - nước - butanol (14 : 29 : 57).

Dung dịch thử: Hòa tan 10 mg chế phẩm trong dung dịch acid hydrochloric 0,03 M (TT) và pha loãng thành 1,0 ml với cùng dung môi.

Dung dịch đối chiếu: Hòa tan 10 mg bacitracin kèm chuẩn trong dung dịch acid hydrochloric 0,03 M (TT) và pha loãng thành 1,0 ml với cùng dung môi.

Cách tiến hành: Chấm riêng biệt lên bản mỏng 10 μl mỗi dung dịch trên. Triển khai sắc ký đến khi dung môi đi được hơn 1/2 chiều dài bản mỏng. Sấy khô bản mỏng ở 100 °C đến 105 °C. Phun lên bản mỏng dung dịch ninhydrin (TT) và sấy ở 110 °C trong 5 min. Các vết trên sắc ký đồ của dung dịch thử có vị trí, kích thước và màu sắc tương tự các vết trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu.

B. Chế phẩm phải đáp ứng yêu cầu phép thử Thành phần cấu trúc.

C. Nung 0,2 g chế phẩm. Cẩn còn lại có màu vàng ở nhiệt độ cao với lượng không đáng kể. Để nguội. Hòa tan cẩn trong 0,1 ml dung dịch acid hydrochloric loãng (TT). Thêm 5 ml nước và 0,2 ml dung dịch natri hydroxyd 10 M (TT). Không tạo tủa trắng.

Độ trong của dung dịch

Dung dịch S: Hòa tan 0,25 g chế phẩm trong nước không có carbon dioxyl (TT), pha loãng thành 25 ml với cùng dung môi.

Dung dịch S phải trong (Phụ lục 9.2).

pH

Từ 6,0 đến 7,0 (Phụ lục 6.2).

Dùng dung dịch S để đo.

Thành phần cấu trúc

Phương pháp sắc ký lỏng (Phụ lục 5.3). Dùng phương pháp chuẩn hóa để tính toán. Chuẩn bị các dung dịch ngay trước khi dùng.

Pha động: Acetonitril - dung dịch B - nước dùng cho sắc ký - methanol (TT) (43 : 100 : 300 : 557).

Dung dịch A: Dung dịch 40 g/l natri edetat (TT) được điều chỉnh đến pH 7,0 bằng dung dịch natri hydroxyd loãng (TT).

Dung dịch B: Hòa tan 54,4 g kali dihydrophosphat (TT) bằng nước dùng cho sắc ký trong bình định mức 2000 ml, thêm nước đến vạch. Điều chỉnh đến pH 6,0 bằng dung dịch dikali hydrophosphat (TT) 3,48 % và lọc qua màng lọc 0,45 µm.

Dung dịch thử: Hòa tan 0,100 g chế phẩm trong pha động và pha loãng thành 50,0 ml bằng pha động.

Dung dịch đối chiếu (1): Hòa tan 20,0 mg bacitracin chuẩn dùng để kiểm tra tính phù hợp hệ thống trong dung dịch A và pha loãng thành 10,0 ml với cùng dung môi.

Dung dịch đối chiếu (2): Pha loãng 5,0 ml dung dịch đối chiếu (1) thành 100,0 ml bằng dung dịch A. Pha loãng 1,0 ml dung dịch thu được thành 10,0 ml bằng dung dịch A.

Dung dịch đối chiếu (3): Để tạo các tạp chất E, F, G và H, làm nóng 4 ml dung dịch đối chiếu (1) trong cách thủy 30 min, để nguội về nhiệt độ phòng.

Điều kiện sắc ký:

Cột kích thước (15 cm × 4,6 mm) được nhồi pha tĩnh *end-capped octadecylsilyl silica gel* dùng cho sắc ký (3,5 µm).

Nhiệt độ cột: (28 ± 2) °C.

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

Tốc độ dòng: 1,0 ml/min.

Thể tích tiêm: 100 µl.

Cách tiến hành:

Tiến hành sắc ký với thời gian gấp 3 lần thời gian lưu của bacitracin A.

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

Sử dụng sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu (1) để xác định pic của tạp chất M và bacitracin A, B₁, B₂ và B₃ (xem Hình 1).

Thời gian lưu tương đối so với bacitracin A (thời gian lưu khoảng 20 min): Tạp chất A khoảng 0,44; tạp chất B khoảng 0,52; tạp chất C khoảng 0,55; bacitracin B₁ khoảng 0,65; bacitracin B₂ khoảng 0,67; bacitracin B₃ khoảng 0,81; tạp chất M khoảng 0,87; tạp chất N khoảng 0,90; tạp chất L khoảng 0,93; tạp chất O khoảng 1,2; tạp chất P và

Q khoảng 1,3; tạp chất F khoảng 1,6; tạp chất G khoảng 1,8; tạp chất H khoảng 2,1; tạp chất E khoảng 2,8. Nếu cần, điều chỉnh thành phần pha động bằng cách thay đổi thể tích dung môi hữu cơ nhưng vẫn giữ nguyên tỷ lệ methanol và acetonitril.

Kiểm tra tính phù hợp của hệ thống: Trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu (1), tỷ số đỉnh - hõm (H_p/H_v) ít nhất là 1,2 trong đó H_p là chiều cao đỉnh pic bacitracin B₂ so với đường nền và H_v là chiều cao tính từ đường nền lên đến đáy hõm giữa pic bacitracin B₂ và pic bacitracin B₁; tỷ số đỉnh - hõm (H_p/H_v) ít nhất là 1,1 trong đó H_p là chiều cao đỉnh pic tạp chất M so với đường nền và H_v là chiều cao tính từ đường nền lên đến đáy hõm giữa pic tạp chất M và pic bacitracin B₃. Trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu (2), tỷ số tín hiệu trên nhiễu ít nhất là 50 đối với pic bacitracin A.

Giới hạn:

Bacitracin A: Ít nhất là 45,0 %.

Tổng bacitracin A, B₁, B₂ và B₃: Ít nhất là 77,0 %.

Ghi chú:

Bacitracin A: 4,10-anhydro[N-[[[(4R)-2-[(1S,2S)-1-amino-2-methylbutyl]-4,5-dihydro-1,3-thiazol-4-yl]carbonyl]-L-leucyl-D-α-glutamyl-L-isoleucyl-L-lysyl-D-ornithyl-L-isoleucyl-D-phenylalanyl-L-histidyl-D-α-aspartyl-L-asparagin].

Bacitracin B₁: 4,10-anhydro[N-[[[(4R)-2-[(1S)-1-amino-2-methylpropyl]-4,5-dihydro-1,3-thiazol-4-yl]carbonyl]-L-leucyl-D-α-glutamyl-L-isoleucyl-L-lysyl-D-ornithyl-L-isoleucyl-D-phenylalanyl-L-histidyl-D-α-aspartyl-L-asparagin].

Bacitracin B₂: 4,10-anhydro[N-[[[(4R)-2-[(1S,2S)-1-amino-2-methylbutyl]-4,5-dihydro-1,3-thiazol-4-yl]carbonyl]-L-leucyl-D-α-glutamyl-L-isoleucyl-L-lysyl-D-ornithyl-L-valyl-D-phenylalanyl-L-histidyl-D-α-aspartyl-L-asparagin].

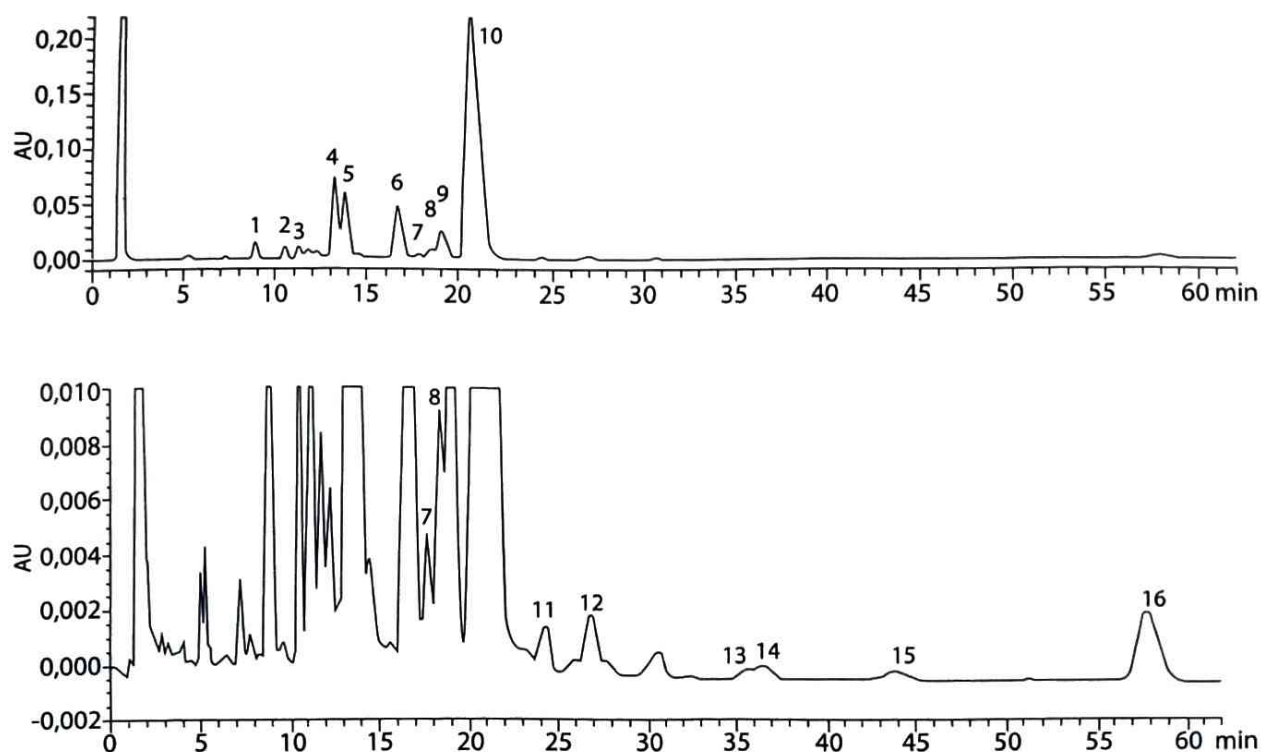
Bacitracin B₃: 4,10-anhydro[N-[[[(4R)-2-[(1S,2S)-1-amino-2-methylbutyl]-4,5-dihydro-1,3-thiazol-4-yl]carbonyl]-L-leucyl-D-α-glutamyl-L-valyl-L-lysyl-D-ornithyl-L-isoleucyl-D-phenylalanyl-L-histidyl-D-α-aspartyl-L-asparagin].

Tạp chất liên quan

Phương pháp sắc ký lỏng (Phụ lục 5.3). Điều kiện sắc ký như mô tả trong phần Thành phần cấu trúc. Dùng phương pháp chuẩn hóa để tính toán.

Tiến hành sắc ký với dung dịch thử, dung dịch đối chiếu (1), (2) và (3).

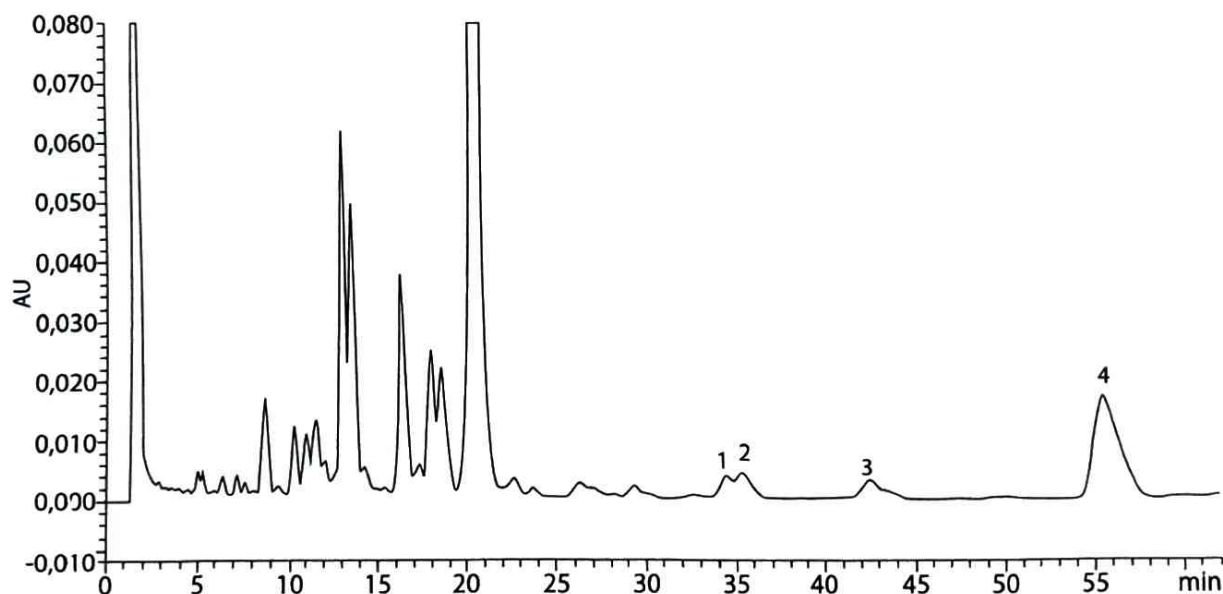
Sử dụng sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu (1) để xác định pic của tạp chất A, B, C, L, M, N, O, P và Q (xem Hình 1); sử dụng sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu (3) để xác định pic của tạp chất E, F, G và H (xem Hình 2).



Hình 1 - Sắc ký đồ của dung dịch thử trong mục Thành phần cấu trúc

Ghi chú:

- | | | | |
|------------------------------|------------------------------|---------------------|----------------|
| 1. Tạp chất A | 5. Bacitracin B ₂ | 9. Tạp chất L | 13. Tạp chất F |
| 2. Tạp chất B | 6. Bacitracin B ₃ | 10. Bacitracin A | 14. Tạp chất G |
| 3. Tạp chất C | 7. Tạp chất M | 11. Tạp chất O | 15. Tạp chất H |
| 4. Bacitracin B ₁ | 8. Tạp chất N | 12. Tạp chất P và Q | 16. Tạp chất E |



Hình 2 - Sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu (3) trong mục Tạp chất liên quan

Ghi chú:

- | | | | |
|---------------|---------------|---------------|---------------|
| 1. Tạp chất F | 2. Tạp chất G | 3. Tạp chất H | 4. Tạp chất E |
|---------------|---------------|---------------|---------------|

Giới hạn:

Tổng tạp chất L và N: Không được quá 8,0 %.
Tạp chất E: Không được quá 4,0 %.
Tạp chất A: Không được quá 3,5 %.
Tạp chất B và M: Với mỗi tạp chất, không được quá 3,0 %.
Tạp chất C: Không được quá 2,5 %.
Tổng tạp chất O, P và Q: Không được quá 2,5 %.
Tổng tạp chất F và G: Không được quá 2,0 %.
Tạp chất H: Không được quá 1,0 %.
Tạp chất khác: Không được quá 2,0 %.
Tổng các tạp chất: Không được quá 23,0 %.
Bò qua các tạp chất có hàm lượng bằng hoặc dưới 0,25 %.

Ghi chú:

Tạp chất A: 4,10-anhydro[N-[[[(4R)-2-[(1S)-1-amino-2-methylpropyl]-4,5-dihydro-1,3-thiazol-4-yl]carbonyl]-L-leucyl-D- α -glutamyl-L-isoleucyl-L-lysyl-D-ornithyl-L-valyl-D-phenylalanyl-L-histidyl-D- α -aspartyl-L-asparagin] (bacitracin D1, bacitracin C2).

Tạp chất B: 4,10-anhydro[N-[[[(4R)-2-[(1S)-1-amino-2-methylpropyl]-4,5-dihydro-1,3-thiazol-4-yl]carbonyl]-L-leucyl-D- α -glutamyl-L-valyl-L-lysyl-D-ornithyl-L-isoleucyl-D-phenylalanyl-L-histidyl-D- α -aspartyl-L-asparagin] (bacitracin D2, bacitracin C3).

Tạp chất C: 4,10-anhydro[N-[[[(4R)-2-[(1S,2S)-1-amino-2-methylbutyl]-4,5-dihydro-1,3-thiazol-4-yl]carbonyl]-L-leucyl-D- α -glutamyl-L-valyl-L-lysyl-D-ornithyl-L-valyl-D-phenylalanyl-L-histidyl-D- α -aspartyl-L-asparagin] (bacitracin D3, bacitracin C1a).

Tạp chất D: 4,10-anhydro[N-[[[(4R)-2-[(1S)-1-amino-2-methylpropyl]-4,5-dihydro-1,3-thiazol-4-yl]carbonyl]-L-leucyl-D- α -glutamyl-L-valyl-L-lysyl-D-ornithyl-L-valyl-D-phenylalanyl-L-histidyl-D- α -aspartyl-L-asparagin] (bacitracin E).

Tạp chất E: 4,10-anhydro[N-[[2-[(2S)-2-methyl-1-oxobutyl]-1,3-thiazol-4-yl]carbonyl]-L-leucyl-D- α -glutamyl-L-isoleucyl-L-lysyl-D-ornithyl-L-isoleucyl-D-phenylalanyl-L-histidyl-D- α -aspartyl-L-asparagin] (bacitracin F).

Tạp chất F: 4,10-anhydro[N-[[2-(2-methyl-1-oxopropyl)-1,3-thiazol-4-yl]carbonyl]-L-leucyl-D- α -glutamyl-L-isoleucyl-L-lysyl-D-ornithyl-L-isoleucyl-D-phenylalanyl-L-histidyl-D- α -aspartyl-L-asparagin] (bacitracin H1).

Tạp chất G: 4,10-anhydro[N-[[2-[(2S)-2-methyl-1-oxobutyl]-1,3-thiazol-4-yl]carbonyl]-L-leucyl-D- α -glutamyl-L-isoleucyl-L-lysyl-D-ornithyl-L-valyl-D-phenylalanyl-L-histidyl-D- α -aspartyl-L-asparagin] (bacitracin H2).

Tạp chất H: 4,10-anhydro[N-[[2-[(2S)-2-methyl-1-oxobutyl]-1,3-thiazol-4-yl]carbonyl]-L-leucyl-D- α -glutamyl-L-valyl-L-lysyl-D-ornithyl-L-isoleucyl-D-phenylalanyl-L-histidyl-D- α -aspartyl-L-asparagin] (bacitracin H3).

Tạp chất I: 4,10-anhydro[N-[[2-(2-methyl-1-oxopropyl)-1,3-thiazol-4-yl]carbonyl]-L-leucyl-D- α -glutamyl-L-isoleucyl-L-lysyl-D-ornithyl-L-valyl-D-phenylalanyl-L-histidyl-D- α -aspartyl-L-asparagin] (bacitracin I1).

Tạp chất J: 4,10-anhydro[N-[[2-(2-methyl-1-oxopropyl)-1,3-thiazol-4-yl]carbonyl]-L-leucyl-D- α -glutamyl-L-valyl-L-lysyl-D-ornithyl-L-isoleucyl-D-phenylalanyl-L-histidyl-D- α -aspartyl-L-asparagin] (bacitracin I2).

Tạp chất K: 4,10-anhydro[N-[[2-[(2S)-2-methyl-1-oxobutyl]-1,3-thiazol-4-yl]carbonyl]-L-leucyl-D- α -glutamyl-L-valyl-L-lysyl-D-ornithyl-L-valyl-D-phenylalanyl-L-histidyl-D- α -aspartyl-L-asparagin] (bacitracin I3).

Tạp chất L: 4,10-anhydro[N-[[[(4R)-2-[(1R,2S)-1-amino-2-methylbutyl]-4,5-dihydro-1,3-thiazol-4-yl]carbonyl]-L-leucyl-D- α -glutamyl-L-isoleucyl-L-lysyl-D-ornithyl-L-isoleucyl-D-phenylalanyl-L-histidyl-D- α -aspartyl-L-asparagin] (bacitracin X).

Tạp chất M: 4,10-anhydro[N-[[2-[(1S,2S)-1-amino-2-methylbutyl]-1,3-thiazol-4-yl]carbonyl]-L-leucyl-D- α -glutamyl-L-isoleucyl-L-lysyl-D-ornithyl-L-isoleucyl-D-phenylalanyl-L-histidyl-D- α -aspartyl-L-asparagin] (bacitracin Y).

Tạp chất N: 4,10-anhydro[N-[[[(4S)-2-[(1S,2S)-1-amino-2-methylbutyl]-4,5-dihydro-1,3-thiazol-4-yl]carbonyl]-L-leucyl-D- α -glutamyl-L-isoleucyl-L-lysyl-D-ornithyl-L-isoleucyl-D-phenylalanyl-L-histidyl-D- α -aspartyl-L-asparagin] (bacitracin Z).

Tạp chất O: 4,10-anhydro[N-[[[(4R)-2-[(1S,2S)-1-amino-2-methylbutyl]-4,5-dihydro-1,3-thiazol-4-yl]carbonyl]-L-leucyl-D- α -glutamyl-5-methylen-L-isoleucyl-L-lysyl-D-ornithyl-L-isoleucyl-D-phenylalanyl-L-histidyl-D- α -aspartyl-L-asparagin] (bacitracin J1).

Tạp chất P: 4,10-anhydro[N-[[[(4R)-2-[(1S,2S)-1-amino-2-methylbutyl]-4,5-dihydro-1,3-thiazol-4-yl]carbonyl]-L-leucyl-D- α -glutamyl-L-isoleucyl-L-lysyl-D-ornithyl-5-methylen-L-isoleucyl-D-phenylalanyl-L-histidyl-D- α -aspartyl-L-asparagin] (bacitracin J2).

Tạp chất Q: 4,10-anhydro[N-[[[(4R)-2-[(1S,2S)-1-amino-2-methylpent-4-en-1-yl]-4,5-dihydro-1,3-thiazol-4-yl]carbonyl]-L-leucyl-D- α -glutamyl-L-isoleucyl-L-lysyl-D-ornithyl-L-isoleucyl-D-phenylalanyl-L-histidyl-D- α -aspartyl-L-asparagin] (bacitracin J3).

Mất khối lượng do làm khô

Không được quá 5,0 % (Phụ lục 9.6).
(1,000 g, 60 °C, phospho pentoxyd, áp suất không quá 0,1 kPa, 3 h).

Tro sulfat

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

Định lượng

Tiến hành định lượng kháng sinh bằng phương pháp vi sinh vật (Phụ lục 13.9). Dùng bacitracin kềm chuẩn làm chất đối chiếu.

Bảo quản

Trong đồ đựng kín, để ở 2 °C đến 8 °C.
Nếu chế phẩm vô khuẩn, bảo quản trong đồ đựng kín, vô khuẩn.

Loại thuốc

Kháng sinh.

Chế phẩm

Thuốc mỡ.