

Tính hàm lượng $C_{16}H_{34}O$ theo diện tích pic của cetyl alcol thu được trên sắc ký đồ của dung dịch thử và dung dịch đối chiếu (1).

Bảo quản

Bao bì kín, tránh ánh sáng.

Loại thuốc

Tá dược.

CHYMOTRYPSIN

Chymotrypsin là enzym thủy phân protein được kết tinh từ dịch chiết tuyến tụy bò, *Bos taurus* Linné (Fam. Bovidae). Chế phẩm phải chứa không ít hơn 1000 đơn vị chymotrypsin trong mỗi mg, tính theo chế phẩm đã làm khô và phải chứa từ 90,0 % đến 110,0 % so với hoạt lực ghi trên nhãn.

Tính chất

Bột kết tinh hoặc bột vô định hình màu trắng. Hơi tan trong nước. Dạng bột vô định hình dễ hút ẩm.

Định tính

A. Lấy khoảng 10 mg chế phẩm, hòa tan trong 10 ml nước đun sôi để nguội. Lấy 0,05 ml dung dịch thu được cho vào khay sứ trắng, thêm 0,2 ml dung dịch cơ chất. Màu đỏ tím xuất hiện trong vòng 3 min.

Dung dịch cơ chất: Cân chính xác 237,0 mg acetyltyrosin ethyl ester (TT) cho vào bình định mức 100 ml, thêm 2 ml ethanol 96 % (TT), lắc đến khi tan. Thêm 20 ml dung dịch đệm phosphat pH 7,0 (chuẩn bị trong phần Định lượng), thêm 1 ml dung dịch đỏ methyl - xanh methylen rồi pha loãng với nước vừa đủ đến vạch.

Dung dịch đỏ methyl - xanh methylen: Trộn đồng thể tích dung dịch đỏ methyl 0,1 % trong ethanol 96 % và dung dịch xanh methylen 0,05 % trong ethanol 96 %.

B. Lấy khoảng 30 mg chế phẩm hòa tan trong dung dịch acid hydrocloric 0,001 M, pha loãng thành 100 ml với cùng dung môi. Phổ hấp thụ từ ngoại (Phụ lục 4.1) của dung dịch thu được trong khoảng bước sóng từ 220 đến 320 nm phải có cực đại ở bước sóng khoảng 281 nm và cực tiểu ở bước sóng khoảng 250 nm.

Mất khối lượng do làm khô

Không được quá 5,0 % (Phụ lục 9.6).
(1,00 g; 60 °C; trong chân không; 4 h).

Tro sulfat

Không được quá 2,5 % (Phụ lục 9.9, phương pháp 2).
Dùng 0,100 g chế phẩm.

Trypsin

Không được quá 1 % (kl/kl).

Dung dịch thử: Hòa tan 100 mg chế phẩm trong 10,0 ml nước.

Dung dịch đối chiếu: Dung dịch trypsin trong nước có nồng độ 0,01 %.

Dung dịch đệm tris(hydroxymethyl)aminomethan pH 8,1 (0,08 M): Hòa tan 294 mg calci clorid (TT) trong 40 ml dung dịch tris(hydroxymethyl)aminomethan 0,20 M, điều chỉnh pH đến 8,1 bằng dung dịch acid hydrocloric 1 N (TT) và pha loãng thành 100 ml với nước.

Dung dịch cơ chất: Cân 98,5 mg tosylarginin methyl ester hydroclorid (TT), cho vào bình định mức dung tích 25 ml. Thêm 5 ml dung dịch đệm tris(hydroxymethyl)aminomethan pH 8,1 và lắc cho đến khi hòa tan cơ chất. Thêm 0,25 ml dung dịch đỏ methyl - xanh methylen (pha ở phần Định tính) và thêm nước vừa đủ đến vạch.

Cách tiến hành:

Dùng micro pipet lấy 50 µl dung dịch thử và dung dịch đối chiếu cho vào hai khay sứ trắng riêng biệt, thêm 0,2 ml dung dịch cơ chất vào mỗi dung dịch. Trong vòng 3 phút, khay sứ chứa dung dịch thử không được có màu đỏ tím tạo thành, khay sứ chứa dung dịch đối chiếu cho màu đỏ tím.

Định lượng

Dung dịch đệm phosphat pH 7,0 (0,067 M): Hòa tan 4,54 g kali dihydrophosphat (TT) trong nước và pha loãng vừa đủ 500 ml với cùng dung môi (dung dịch A). Hòa tan 4,73 g dinatri hydrophosphat khan (TT) trong nước và pha loãng vừa đủ 500 ml với cùng dung môi (dung dịch B). Trộn 38,9 ml dung dịch A với 61,1 ml dung dịch B. Điều chỉnh tới pH 7,0 bằng cách thêm từng giọt dung dịch B nếu cần.

Dung dịch cơ chất: Hòa tan 23,7 mg acetyltyrosin ethyl ester (TT) (loại thích hợp để dùng định lượng chymotrypsin) trong khoảng 50 ml dung dịch đệm phosphat pH 7,0 bằng cách làm ấm. Để nguội, thêm dung dịch đệm phosphat pH 7,0 vừa đủ 100 ml.

Lưu ý: Có thể bảo quản đông lạnh dung dịch cơ chất và được sử dụng sau khi rã đông, nhưng phải làm đông lạnh ngay sau khi pha.

Dung dịch thử: Cân chính xác một lượng chế phẩm thích hợp (W) và hòa tan trong dung dịch acid hydrocloric 0,0012 M để thu được dung dịch có nồng độ từ 12 - 16 đơn vị chymotrypsin trong 1 ml. Dùng dung dịch có nồng độ thấp hơn hoặc cao hơn nếu cần sao cho trong quá trình định lượng sự thay đổi độ hấp thụ trong khoảng từ 0,008 đến 0,012 trong mỗi 30 s.

Cách tiến hành:

Định lượng bằng máy quang phổ từ ngoại thích hợp, có hệ thống điều nhiệt để duy trì nhiệt độ buồng chứa cốc đo ở $25 \pm 0,1$ °C. Xác định nhiệt độ trong cốc đo trước và sau khi đo độ hấp thụ để đảm bảo nhiệt độ không thay đổi quá 0,5 °C. Hút chính xác 0,2 ml dung dịch acid hydrocloric 0,0012 M và 3,0 ml dung dịch cơ chất vào cốc đo dày 1 cm. Đặt cốc đo vào máy quang phổ từ ngoại và điều chỉnh thiết bị để có độ hấp thụ là 0,200 ở 237 nm.

Hút chính xác 0,2 ml dung dịch thử cho vào cốc đo dày 1 cm, thêm 3,0 ml dung dịch cơ chất, trộn đều. Đặt cốc đo vào máy quang phổ từ ngoại và đo ngay độ hấp thụ.

Đo độ hấp thụ sau mỗi 30 s trong ít nhất 5 min. Lập lại thí nghiệm cùng độ pha loãng ít nhất một lần. Giá trị tuyệt đối

của độ hấp thụ không quan trọng bằng tốc độ suy giảm hằng định của độ hấp thụ. Nếu tốc độ suy giảm của độ hấp thụ không duy trì được hằng định trong khoảng thời gian ít nhất là 3 min, phải làm lại thí nghiệm, nếu cần sử dụng dung dịch thử có nồng độ thích hợp.

Vẽ đường biểu diễn độ hấp thụ theo thời gian, lấy giá trị độ hấp thụ làm tung độ và thời gian làm hoành độ. Chọn đoạn tuyến tính trong vòng 3 min để xác định hoạt lực của mẫu thử.

Một đơn vị chymotrypsin là hoạt tính làm thay đổi độ hấp thụ là 0,0075 trong mỗi phút với các điều kiện quy định của phương pháp định lượng này.

Tính hoạt lực (đơn vị) chymotrypsin có trong mỗi mg chế phẩm theo công thức:

$$\frac{(A_1 - A_2) \times D}{T \times 0,0075 \times W \times 0,2}$$

Trong đó:

A_1 là độ hấp thụ ở thời điểm đầu trong khoảng biến thiên độ hấp thụ tuyến tính;

A_2 là độ hấp thụ ở thời điểm cuối trong khoảng biến thiên độ hấp thụ tuyến tính;

T là khoảng thời gian giữa lần đọc đầu và lần đọc cuối (min);

D là độ pha loãng của dung dịch thử;

W là khối lượng mẫu thử (mg).

Giới hạn nhiễm vi sinh vật

Không được có *Pseudomonas aeruginosa*, các chủng *Salmonella* và *Staphylococcus aureus* (Phụ lục 13.6).

Bảo quản

Trong bao bì kín, để nơi khô mát, tránh ánh sáng.

Loại thuốc

Enzym thủy phân protein.

VIÊN NÉN CHYMOTRYPSIN

Là viên nén chứa chymotrypsin.

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

Hoạt lực chymotrypsin, từ 90,0 % đến 120,0 % so với hoạt lực ghi trên nhãn.

Định tính

A. Lấy một lượng bột viên tương ứng với 4,2 mg chymotrypsin, hòa tan trong 4 ml nước đun sôi để nguội, lọc. Lấy 0,05 ml dịch lọc cho vào khay sứ trắng, thêm 0,2 ml dung dịch cơ chất. Màu đỏ tím xuất hiện trong vòng 3 min.

Dung dịch cơ chất: Cân chính xác 237,0 mg acetyltyrosin ethyl ester (TT) cho vào bình định mức 100 ml, thêm 2 ml ethanol (TT), lắc đến khi tan. Thêm 20 ml dung dịch đệm phosphat pH 7,0 (chuẩn bị trong phần định lượng), thêm

1 ml dung dịch đỏ methyl - xanh methylen rồi pha loãng với nước vừa đủ.

Dung dịch đỏ methyl - xanh methylen: Trộn đồng thể tích dung dịch đỏ methyl 0,1 % trong ethanol 96% và dung dịch xanh methylen 0,05 % trong ethanol 96%.

B. Lấy một lượng bột viên tương ứng với 30 mg chymotrypsin hòa tan trong dung dịch acid hydrocloric 0,001 M, pha loãng thành 100 ml với cùng dung môi, lọc. Phổ hấp thụ từ ngoại (Phụ lục 4.1) của dịch lọc thu được trong khoảng bước sóng từ 220 đến 320 nm phải có cực đại ở bước sóng 281 nm và cực tiểu ở 250 nm.

Định lượng

Dung dịch đệm phosphat pH 7,0: Hòa tan 4,54 g kali dihydrophosphat (TT) trong nước và pha loãng thành 500 ml với cùng dung môi (dung dịch A). Hòa tan 4,73 g dinatri hydrophosphat khan (TT) trong nước và pha loãng thành 500 ml với cùng dung môi (dung dịch B). Trộn 38,9 ml dung dịch A với 61,1 ml dung dịch B. Điều chỉnh tới pH 7,0 bằng cách thêm từng giọt dung dịch B nếu cần.

Dung dịch cơ chất: Hòa tan 23,7 mg acetyltyrosin ethyl ester (TT) (loại thích hợp để dùng định lượng chymotrypsin) trong khoảng 50 ml dung dịch đệm phosphat pH 7,0 bằng cách làm ấm. Để nguội, thêm dung dịch đệm phosphat pH 7,0 vừa đủ 100,0 ml. Lưu ý: Có thể bảo quản đông lạnh dung dịch cơ chất và được sử dụng sau khi rã đông, nhưng phải làm đông lạnh ngay sau khi pha.

Dung dịch thử: Cân 20 viên, tính khối lượng trung bình và nghiền thành bột mịn. Cân chính xác một lượng bột viên thích hợp và hòa tan trong dung dịch acid hydrocloric 0,0012 M để thu được dung dịch có nồng độ từ 12 đến 16 đơn vị chymotrypsin trong 1 ml. Dùng dung dịch có nồng độ thấp hơn hoặc cao hơn (nếu cần) để trong quá trình định lượng sự thay đổi độ hấp thụ trong khoảng từ 0,008 đến 0,012 trong mỗi 30 s.

Cách tiến hành

Lưu ý: Xác định sự thích hợp của cơ chất và kiểm tra sự điều chỉnh máy quang phổ từ ngoại bằng cách tiến hành sử dụng chymotrypsin chuẩn thay thế mẫu thử.

Định lượng bằng máy quang phổ từ ngoại thích hợp, có hệ thống điều nhiệt để duy trì nhiệt độ buồng chứa cốc đo ở $25 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Xác định nhiệt độ trong cốc đo trước và sau khi đo độ hấp thụ để đảm bảo nhiệt độ không thay đổi quá $0,5^\circ\text{C}$.

Hút chính xác 0,2 ml dung dịch acid hydrocloric 0,0012 M và 3,0 ml dung dịch cơ chất vào cốc đo dày 1 cm. Đặt cốc đo vào máy quang phổ từ ngoại và điều chỉnh thiết bị để có độ hấp thụ là 0,200 ở 237 nm.

Hút chính xác 0,2 ml dung dịch thử cho vào cốc đo dày 1 cm, thêm chính xác 3,0 ml dung dịch cơ chất. Đặt cốc đo vào máy quang phổ từ ngoại (Chú ý: Thực hiện thêm mẫu vào cốc đo đúng theo thứ tự này, và bắt đầu ghi thời gian phản ứng ngay sau khi thêm dung dịch cơ chất).