

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 mục Định lượng, pic chính trên sắc ký đồ của dung dịch dẫn xuất thử phải có thời gian lưu 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.

Tiến hành sắc ký với 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.

Tiến hành sắc ký với dung dịch dẫn xuất chuẩn, độ lệch chuẩn tương đối của diện tích pic từ 6 lần tiêm lặp lại dung dịch dẫn xuất chuẩn không được 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 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

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

Loại thuốc

Kháng sinh.

Hàm lượng thường dùng

Dung dịch 0,3 %.

THUỐC TIÊM TOBRAMYCIN

Là dung dịch vô khuẩn của tobramycin sulfat trong nước để pha thuốc tiêm hoặc tobramycin trong nước để pha thuốc tiêm có thêm acid sulfuric.

Chế phẩm phải đáp ứng các yêu cầu chung trong chuyên luận "Thuốc tiêm, thuốc tiêm truyền" (Phụ lục 1.19) 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 tiêm với nước để thu được dung dịch có nồng độ tobramycin 3 mg/ml.

Dung dịch đối chiếu (1): 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 µl mỗi dung dịch 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 mục Định lượng, pic chính trên sắc ký đồ của dung dịch dẫn xuất thử phải có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của pic chính trên sắc ký đồ của dung dịch dẫn xuất chuẩn.

pH

Từ 3,0 đến 6,5 (Phụ lục 6.2).

Nội độc tố vi khuẩn

Không được quá 2,0 EU/mg tobramycin.

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 µm. 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 này 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 1 lượng thể tích chế phẩm, pha loãng với nước để thu được dung dịch có nồng độ tobramycin khoảng 0,2 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 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 °C ± 2 °C trong 50 min ± 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 × 4,6 mm), được nhồi pha tĩnh C (5 µm).

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

Tốc độ dòng: 1,2 ml/min.

Thể tích tiêm: 20 µl.

Cách tiến hành:

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

Tiến hành sắc ký với 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.

Tiến hành sắc ký với dung dịch dẫn xuất chuẩn, độ lệch chuẩn tương đối của diện tích pic từ 6 lần tiêm lặp lại dung dịch dẫn xuất chuẩn 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, C₁₈H₃₇N₅O₉, 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

Nơi mát, tránh ánh sáng.

Loại thuốc

Kháng sinh.

Nồng độ thường dùng

20 mg/ml; 80 mg/ml.

NANG TRAMADOL

Là nang cứng chứa tramadol hydroclorid.

Chế phẩm phải đáp ứng các yêu cầu trong chuyên luận "Thuốc nang" (Phụ lục 1.13) và các yêu cầu sau đây:

Hàm lượng tramadol hydroclorid, $C_{16}H_{25}NO_2.HCl$, từ 95,0 % đến 105,0 % so với lượng ghi trên nhãn.

Định tính

A. Lắc một lượng bột thuốc trong nang tương ứng với khoảng 50 mg tramadol hydroclorid với 25 ml *methanol* (TT) trong 5 min, lọc và bốc hơi dịch lọc đến cạn. Phở hấp thụ hồng ngoại (Phụ lục 4.2) của cặn thu được phải phù hợp với phở hấp thụ hồng ngoại đối chiếu của tramadol hydroclorid.

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 tramadol trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn.

Độ hòa tan (Phụ lục 11.4)

Thiết bị: Kiểu gio quay.

Môi trường hòa tan: 900 ml dung dịch acid hydrocloric 0,1 M (TT).

Tốc độ quay: 100 r/min.

Thời gian: 30 min.

Cách tiến hành:

Phương pháp sắc ký lỏng (Phụ lục 5.3).

Pha động, điều kiện sắc ký và dung dịch đối chiếu (2) để kiểm tra tính phù hợp của hệ thống như mô tả trong phần Tạp chất liên quan.

Dung dịch chuẩn: Dung dịch chứa 0,055 mg/ml tramadol hydroclorid chuẩn trong dung dịch acid hydrocloric 0,1 M (TT).

Dung dịch thử: Sau thời gian hòa tan quy định, lấy một phần dịch hòa tan và lọc qua màng lọc thích hợp, pha loãng nếu cần với dung dịch acid hydrocloric 0,1 M (TT) để thu được dung dịch có nồng độ tramadol hydroclorid tương đương dung dịch chuẩn.

Tính lượng tramadol hydroclorid đã hòa tan từ diện tích pic thu được trên sắc ký đồ của dung dịch thử, dung dịch chuẩn và hàm lượng $C_{16}H_{25}NO_2.HCl$ của tramadol hydroclorid chuẩn.

Yêu cầu: Không ít hơn 80 % (Q) lượng tramadol hydroclorid, $C_{16}H_{25}NO_2.HCl$, so với lượng ghi trên nhãn được hòa tan trong 30 min.

Tạp chất liên quan

Phương pháp sắc ký lỏng (Phụ lục 5.3).

Pha động: Acid trifluoroacetic - acetonitril - nước (1 : 30 : 69).

Dung dịch thử: Cân chính xác một lượng bột thuốc trong nang tương ứng với khoảng 0,5 g tramadol hydroclorid vào bình định mức 100 ml. Thêm 80 ml pha động, siêu âm để hòa tan, để nguội và thêm pha động đến vạch, lắc đều. Lọc qua màng lọc phù hợp.

Dung dịch đối chiếu (1): Pha loãng 2,0 ml dung dịch thử thành 100,0 ml bằng pha động. Tiếp tục pha loãng 1,0 ml dung dịch thu được thành 10,0 ml bằng pha động

Dung dịch đối chiếu (2): Dung dịch chứa 0,0015 % tramadol hydroclorid chuẩn và 0,0015 % tạp chất A chuẩn của tramadol trong pha động.

Điều kiện sắc ký:

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

Detector quang phổ tử ngoại đặt ở bước sóng 271 nm.

Tốc độ dòng: 1,0 ml/min.

Thể tích tiêm: 20 μl.

Cách tiến hành:

Tiến hành sắc ký dung dịch thử với thời gian gấp 4 lần thời gian lưu của pic chính.

Kiểm tra tính phù hợp của hệ thống: Trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu (2), độ phân giải giữa pic tramadol và pic tạp chất A của tramadol ít nhất là 3,0.

Giới hạn: Trên sắc ký đồ của dung dịch thử:

Tạp chất A: Diện tích pic tương ứng với tạp chất A không được lớn hơn 1,5 lần diện tích pic chính thu được trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu (1) (0,3 %).

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) (0,2 %).

Tổng diện tích pic của tất cả các tạp chất không được lớn hơn 5 lần diện tích pic chính thu được trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu (1) (1 %).

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

Định lượng

Phương pháp sắc ký lỏng (Phụ lục 5.3). Pha động, dung dịch đối chiếu (2) và điều kiện sắc ký như mô tả trong phần Tạp chất liên quan.

Dung dịch thử: Cân 20 nang, tính khối lượng trung bình bột trong nang và nghiền thành bột mịn. Cân chính xác một lượng bột thuốc tương ứng với khoảng 50 mg tramadol