



(12) **BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ**

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)**
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11) 
1-0021389

(51)⁷ **C07H 17/08, A61K 31/7048, A61P 31/04, (13) B**
C12P 19/62, C12R 1/465, A61P 31/10

(21)	1-2012-03865	(22)	25.05.2011		
(86)	PCT/CN2011/074658	25.05.2011	(87)	WO2011/147316	01.12.2011
(30)	201010182027.9	25.05.2010	CN		
(45)	25.07.2019	376	(43)	25.04.2013	301
(73)	SHENYANG FUYANG PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY CO. LTD (CN) No. 18-12 Yaoyang Street, Shenbei New District, Shenyang, Liaoning, 110013, China				
(72)	Yang JIANG (CN), Yuyou HAO (CN)				
(74)	Công ty TNHH Tâm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)				

(54) **HỢP CHẤT LEVOCARIMYXIN, DƯỢC PHẨM VÀ PHƯƠNG PHÁP ĐIỀU CHẾ HỢP CHẤT NÀY**

(57) Sáng chế đề xuất hợp chất levocarimyxin, dược phẩm chứa nó, các phương pháp điều chế và ứng dụng của nó. Levocarimyxin là hỗn hợp gồm các thành phần chủ yếu là isovalerylspiramyxin III, II và I và chứa một lượng nhất định isobutyrylspiramyxin III và II, butyrylspiramyxin III và II, propionylspiramyxin III và II, cũng như axetylspiramyxin III và II, trong số đó, hàm lượng của isovalerylspiramyxin III không nhỏ hơn 30% trọng lượng, tổng hàm lượng của isovalerylspiramyxin III, II và I không nhỏ hơn 60% trọng lượng, và hàm lượng của axylspiramyxin nằm trong khoảng từ 80% đến 98% trọng lượng. Độ quay quang riêng của levocarimyxin là $[\alpha]_D = -52^\circ$ đến -57° trong dung dịch clorofom với nồng độ 0,02g/ml ở nhiệt độ bằng 25°C. Sáng chế còn đề xuất hợp chất isovalerylspiramyxin III, II hoặc I ở dạng tinh thể trong levocarimyxin, và dược phẩm chứa levocarimyxin. Theo sáng chế, các thành phần hoạt tính trong levocarimyxin hoặc dược phẩm chứa nó có tính quay quang và tác dụng chống nhiễm khuẩn mỹ mẫn.

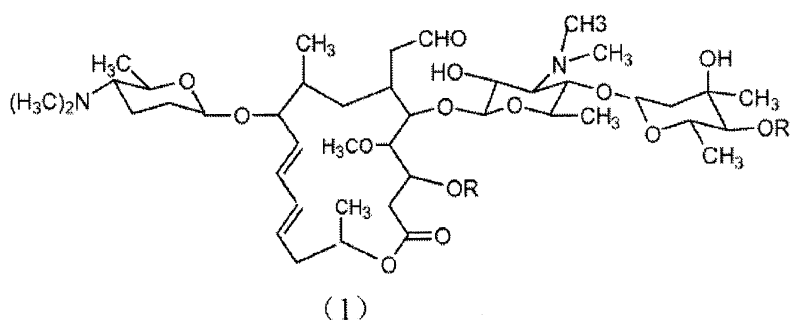
Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến lĩnh vực thuốc chứa carimyxin thô và dược phẩm chứa chúng, cụ thể là đến thuốc kháng sinh phân tử vòng lớn được bào chế theo kỹ thuật di truyền, đặc biệt là đến levocarimyxin, phương pháp điều chế nó và sử dụng nó để bào chế thuốc nhằm điều trị và phòng ngừa các bệnh truyền nhiễm.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Carimyxin là dẫn xuất mới của spiramycin được phát triển bằng cách áp dụng kỹ thuật di truyền, ban đầu được gọi là biotechspiramycin và trước đây được gọi là biotechmyxin [Patent số: ZL97104440.6]. Theo tài liệu: “Rules for Chinese Approved Drug Names”, và dựa trên sự xem xét các đặc tính kỹ thuật và xác nhận của Hội đồng Dược điển Trung Quốc (Chinese Pharmacopoeia Commission), tên gốc Trung Quốc của biotechspiramycin được đổi thành carimyxin. Carimyxin là sản phẩm lên men của vi khuẩn theo kỹ thuật di truyền. Cấu trúc hoá học của carimyxin chủ yếu gồm 4''-isovalerylspiramycin, bao gồm 4''-isovalerylspiramycin I, II, III, và khoảng 6 loại spiramycin axyl hóa ở 4''-hydroxy, vì vậy, có tên hoá học là 4''-axylspiramycin.

Công thức cấu tạo hóa học của thành phần chủ yếu của carimyxin là như được thể hiện trong công thức (1):



trong đó:

	R	R'
Isovalerylspiramycin I	H	COCH ₂ CH(CH ₃) ₂
Isovalerylspiramycin II	COCH ₃	COCH ₂ CH(CH ₃) ₂

Isovalerylspiramycin III COCH_2CH_3 $\text{COCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$

Carimyxin là thuốc kháng sinh phân tử vòng lớn có nhân gồm 16 cạnh, có khả năng ức chế quá trình tổng hợp protein bằng cách kết hợp với ribosom của vi khuẩn.

Các kết quả thử nghiệm *in vitro* cho thấy carimyxin là hữu hiệu đối với vi khuẩn gram dương, đặc biệt là một số vi khuẩn kháng thuốc như *Staphylococcus aureus* kháng β -lactam và *Staphylococcus aureus* kháng erythroxin, và không kháng chéo một cách rõ ràng với các loại thuốc tương tự. Trong khi đó, carimyxin có hoạt tính kháng khuẩn với *Mycoplasma* và *Chlamydia*, cũng như một số vi khuẩn gram âm, hoạt tính kháng khuẩn mạnh và có khả năng thấm qua mô đối với *Toxoplasma* và *Legionella* gây bệnh dịch, và vẫn có chức năng điều hòa miễn dịch một cách tiềm tàng. Hoạt tính kháng khuẩn *in vivo* này mạnh hơn nhiều so với hoạt tính kháng khuẩn *in vitro* (ZL200310122420.9). Các nghiên cứu lâm sàng cho thấy rằng cách dùng viên nén carimyxin với hàm lượng từ 0,2mg đến 0,4mg hằng ngày trong thời gian từ 5 ngày đến 7 ngày là thích hợp để điều trị bệnh viêm họng cấp tính do vi khuẩn và bệnh viêm amidan mũ cấp tính do *Streptococcus* sinh mũ gây ra; bệnh viêm xoang do vi khuẩn và bệnh viêm phế quản cấp tính do vi khuẩn nhạy cảm gây ra; bệnh viêm phổi nhẹ do *Streptococcus pneumonia*, *Haemophilus influenza* và *Mycoplasma pneumonia* gây ra; bệnh viêm niệu đạo không do lậu do *Mycoplasma* và *Chlamydia* gây ra; các bệnh truyền nhiễm như nhiễm khuẩn da và mô mềm, bệnh viêm quanh răng và bệnh viêm tai giữa do vi khuẩn nhạy cảm gây ra. Tổng tỷ lệ hữu hiệu bằng 92,68%. Carimyxin là an toàn và hữu hiệu.

Nghiên cứu dược lực học cho thấy rằng các thành phần hoạt tính của carimyxin chủ yếu là isovalerylspiramycin I, II và III. Carimyxin chuyển hóa một cách nhanh chóng thành spiramycin *in vivo*. Theo AUC_{0-t} của thuốc gốc isovalerylspiramycin I, II và II và chất chuyển hóa hoạt tính spiramycin I, II và III, độ sinh khả dụng tuyệt đối khi dùng qua đường miệng trung bình bằng 91,6%. Đã có thông báo rằng độ sinh khả dụng tuyệt đối của spiramycin khi dùng qua đường miệng nằm trong khoảng từ 30% đến 40% (Frydman AM et al J Antimicrob Chemother.1988, 22 (suppl B):93-103). Đã phát hiện ra rằng isovalerylspiramycin cải thiện một cách đáng kể độ sinh khả dụng của thành phần hoạt tính spiramycin. Liều đơn carimyxin được loại bỏ một cách từ từ. $T_{1/2}$ nằm trong khoảng từ 23 giờ đến 27 giờ.

Các nghiên cứu về các thành phần hoạt tính của carimyxin cho thấy rất nhiều

nguyên tử cacbon không đối xứng tồn tại trong cấu trúc phân tử của các thành phần hoạt tính của carimyxin: isovalerylspiramycin I, II và III. Tính không đối xứng là thuộc tính cơ bản của vật thể ba chiều và một trong số các thuộc tính thiết yếu của tự nhiên. Các đại phân tử sinh học bao gồm protein, polysacarit, axit nucleic và enzym, là nền tảng quan trọng của hoạt động sống, thường có các chức năng sinh lý quan trọng. Thuốc không đối xứng là cặp chất đồng phân đối ảnh của đối tượng nguyên liệu và ảnh chiếu qua gương thu được sau khi cấu trúc phân tử của thuốc được đưa vào tâm không đối xứng. Các chất đồng phân đối ảnh này hầu như giống nhau về đặc tính hóa lý nhưng khác nhau về tính quay quang. Các chất đồng phân đối ảnh lần lượt là được gọi là loại R (quay phải) hoặc loại S (quay trái), và triệt quang. Trong vòng 20 năm trở lại đây, do các nghiên cứu dược học được tiến hành một cách thấu đáo hơn, đã chứng minh được rằng sự khác biệt về ái lực của chất đồng phân đối ảnh của thuốc với thụ thể gây ra sự khác biệt về độ chọn lọc lập thể của chất đồng phân đối ảnh của thuốc, dẫn đến sự khác biệt đáng kể về tác dụng dược lý. Chất đồng phân đối ảnh có hoạt tính mạnh trong số các thuốc không đối xứng được gọi là eutome; còn chất đồng phân đối ảnh không có hoặc có hoạt tính thấp được gọi là distome. Trong nhiều trường hợp, distome không chỉ không có tác dụng dược lý, mà còn bù đắp cho hoạt tính của eutome. Đôi khi, các phản ứng phụ gây độc nghiêm trọng cũng xảy ra, cho thấy độ phức tạp của sự khác biệt về chức năng dược lý và xác định sự khác biệt đáng kể về chỉ số điều trị của từng chất đồng phân đối ảnh và raxemat của chúng. Ví dụ, tác dụng chữa bệnh của DL-(+/-) syntomyxin đã biết bằng một nửa tác dụng của D(-) cloramphenicol; hoạt tính dược lý của chất đồng phân L propranolol lớn hơn 100 lần hoạt tính của chất đồng phân D; (-) adanon là thuốc giảm đau mạnh trong khi dạng (+) là không hiệu nghiệm. Ngoài ra, cũng có sự khác biệt về độc tính. Ví dụ, hai chất đồng phân đối ảnh của thalidomit có tác dụng an thần đối với chuột giống nhau, nhưng chỉ chất đồng phân S(-) và chất chuyển hóa của chúng có khả năng gây độc thai và sinh quái thai; ketamin là thuốc gây mê và thuốc giảm đau được sử dụng một cách rộng rãi, nhưng có các tác dụng phụ như bị ảo giác. Các nghiên cứu cho thấy S (+) có độ hiệu nghiệm gấp từ 3 đến 4 dạng R(-) và các tác dụng phụ gây độc chỉ xuất hiện ở dạng thứ hai. Sự khác biệt đáng kể về tác dụng chữa bệnh của các thuốc không đối xứng đã thúc đẩy việc nghiên cứu và phát triển thuốc không đối xứng và việc phát triển phép phân tích tách. Bằng cách áp dụng kỹ thuật “không đối xứng”, các tác giả sáng chế có thể loại bỏ một cách hữu hiệu các dạng không có tác dụng hoặc các tác dụng phụ gây độc ra khỏi thuốc và tạo ra thuốc

không đối xứng tinh khiết với cấu trúc đơn lẻ và định hướng, do vậy tạo ra các thành phần được tính tinh khiết hơn, đẩy mạnh thêm tác dụng chữa bệnh và rút ngắn thời gian điều trị. Vì vậy, việc nghiên cứu về thuốc không đối xứng đã trở thành một trong số các phương pháp mới để nghiên cứu được phẩm mới trên toàn thế giới. Chính phủ của các nước và các tập đoàn dược phẩm đã đầu tư rất mạnh vào các lĩnh vực như bào chế thuốc không đối xứng, nguyên liệu không đối xứng và sản phẩm trung gian không đối xứng để nghiên cứu và phát triển, nhằm mục đích chiếm lĩnh địa vị thống trị trên thị trường dược phẩm không đối xứng. Ngoài ra, cùng với sự cải tiến không ngừng của kỹ thuật không đối xứng, đặc biệt là việc áp dụng rộng rãi và nhanh chóng phương pháp sắc ký lỏng, phép phân tích tách và xác định các chất đồng phân đối ảnh của thuốc không đối xứng cũng được thúc đẩy. Thuốc không đối xứng của từng chất đồng phân đối ảnh đã được sử dụng một cách rộng rãi.

Qua nhiều nghiên cứu để xác định carimyxin có tính quay quang hay không, các tác giả sáng chế đã bất ngờ phát hiện ra rằng bằng cách điều chỉnh và tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy và điều kiện lên men, các tác giả sáng chế đã tinh cở thu được levocarimyxin có tính quay quang, là hợp chất có hoạt tính chống nhiễm khuẩn mạnh hơn. Vì vậy, sáng chế đề xuất levocarimyxin, phương pháp điều chế của chúng và sử dụng chúng để bào chế thuốc nhằm phòng ngừa và điều trị các bệnh truyền nhiễm.

CN 1 554 355 A và CN 1 405 299 A và YANG YALI et al. “Determination of the components of bitespiramicyn by HPLC”, YAO HSEUH HSEUH PAO – ACTA PHARMACEUTICAL SINICA, YAOXUE XUEBAO, CN, quyển 44, số 10, 1/1/2009, trang 1183, XP009173043, ISSN: 0513-4870, là các tài liệu tiêu biểu của tình trạng kỹ thuật.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo mục đích thứ nhất, sáng chế đề xuất levocarimyxin, đồng thời có tính quay quang và hoạt tính chống nhiễm khuẩn mạnh hơn.

Theo mục đích thứ hai, sáng chế đề xuất dược phẩm, dược phẩm này chứa levocarimyxin có tính quay quang được đề xuất theo sáng chế và chất mang dược dụng.

Theo mục đích thứ ba, sáng chế đề xuất phương pháp điều chế levocarimyxin, phương pháp này được đặc trưng bởi quy trình sản xuất được đơn giản hóa và dễ kiểm soát tiêu chuẩn chất lượng, và levocarimyxin bào chế được có tác dụng tốt, độ quay quang

tốt và hoạt tính chống nhiễm khuẩn mạnh hơn.

Theo mục đích thứ tư, sáng chế đề xuất việc sử dụng levocarimyxin hoặc dược phẩm chứa levocarimyxin này để bào chế thuốc nhằm điều trị và phòng ngừa các bệnh truyền nhiễm. Cụ thể, levocarimyxin hoặc dược phẩm chứa levocarimyxin có tác dụng mạnh đối với vi khuẩn, Chlamydia và Mycoplasma và có thể được sử dụng làm thuốc điều trị các bệnh truyền nhiễm.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là đường cong biểu thị sự thay đổi của độ pH theo thời gian trong quy trình lên men theo Ví dụ 1 của sáng chế;

Hình 2 là đường cong biểu thị sự thay đổi của độ pH theo thời gian trong quy trình lên men theo Ví dụ 2 của sáng chế;

Hình 3 là đường cong biểu thị sự thay đổi của độ pH theo thời gian trong quy trình lên men theo Ví dụ 3 của sáng chế;

Hình 4 là biểu đồ sắc ký lỏng của các thành phần carimyxin chuẩn, trong số các hợp chất này,

1-spiramycin III

2-monoaxetyl spiramycin II

3-monoaxetyl spiramycin III

4-propionylspiramycin II

5-propionylspiramycin III

6-(iso-)butyrylspiramycin II

7-isovalerylspiramycin I

8-(iso-)butyrylspiramycin III

9-isovalerylspiramycin II

10-isovalerylspiramycin III

Hình 5 là biểu đồ sắc ký lỏng của levocarimyxin được nêu trong Ví dụ 4 của sáng chế.

Hình 6 là phổ nhiễu xạ bột tia X của hợp chất levoisovalerylspiramycin I ở dạng tinh thể theo sáng chế;

Hình 7 là phổ nhiễu xạ bột tia X của hợp chất levoisovalerylspiramycin II ở dạng tinh thể theo sáng chế;

Hình 8 là phổ nhiễu xạ bột tia X của hợp chất levoisovalerylspiramycin III ở dạng tinh thể theo sáng chế.

Mô tả chi tiết sáng chế

Để đạt được mục đích thứ nhất của sáng chế, các giải pháp kỹ thuật sau được áp dụng:

Levocarimyxin, levocarimyxin là hỗn hợp gồm các thành phần chủ yếu là isovalerylspiramycin III, II và I và chứa isobutyrylsipramycin III và II, butyrylsipramycin III và II, propionylspiramycin III và II, cũng như axetylspiramycin III và II với hàm lượng nhất định, trong số các hợp chất này hàm lượng của isovalerylspiramycin III không nhỏ hơn 30% trọng lượng, tổng hàm lượng của isovalerylspiramycin III, II và I không nhỏ hơn 60% trọng lượng, và hàm lượng của axylspiramycin nằm trong khoảng từ 80% đến 98% trọng lượng, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 85% đến 98% trọng lượng, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 90% đến 98% trọng lượng và tốt nhất là nằm trong khoảng từ 95% đến 98% trọng lượng; độ quay quang học riêng của levocarimyxin bằng $[\alpha]_D = -52^\circ$ đến -57° trong dung dịch clorofom với nồng độ 0,02g/ml ở nhiệt độ bằng 25°C , tốt hơn là nằm trong khoảng từ -54° đến -56° và tốt hơn nữa là -55° .

Các tác giả sáng chế đã tiến hành rất nhiều nghiên cứu về carimyxin. Bằng cách điều chỉnh và tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy và điều kiện lên men, đặc biệt là bằng cách kiểm soát một cách nghiêm ngặt độ pH trong quy trình lên men bằng chất điều chỉnh độ pH, các đường cong thể hiện sự biến đổi độ pH theo thời gian thể hiện ba pha liên tục và mỗi pha lần lượt thỏa mãn công thức nhất định, do vậy thu được levocarimyxin có tính quay quang. Lý do của việc này là hàm lượng của các hợp phần có tính quay quang bị thay đổi trong các điều kiện lên men hoặc cấu hình quang học bị thay đổi trong các điều kiện lên men. Phương pháp xác định độ quay quang học riêng của levocarimyxin theo sáng chế bao gồm các bước: cân một cách chính xác levocarimyxin điều chế được theo sáng chế, bổ sung dung dịch clorofom vào và pha loãng thành dung dịch có nồng độ khoảng 10mg/ml; đo độ quay quang bằng cách sử dụng dòng D của phổ natri (589,3nm) với chiều

dài đo bằng 1dm và nhiệt độ đo bằng 25°C và sử dụng thiết bị đo độ phân cực đã được kiểm tra với độ chính xác bằng 0,0001°.

Khoảng nhiệt độ nóng chảy của levocarimyxin theo sáng chế nằm trong khoảng từ 112°C đến 122°C, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 114°C đến 120°C, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 116°C đến 118°C.

Phương pháp xác định khoảng nhiệt độ nóng chảy là: cho lượng thích hợp của sản phẩm đã sấy khô vào ống mao quản để xác định nhiệt độ nóng chảy; lặp lại việc xác định này trong 3 lần và lấy trị số trung bình.

Levocarimyxin theo sáng chế có tính quay quang. Theo nghiên cứu dược lý hiện đại, sự khác biệt về ái lực của chất đồng phân đối ảnh của thuốc với thụ thể gây ra bởi sự khác biệt về độ chọn lọc lập thể của chất đồng phân đối ảnh của thuốc, dẫn đến sự khác biệt đáng kể về tác dụng dược lý. Các thử nghiệm dược lực học *in vivo* và *in vitro* chứng minh rằng levocarimyxin theo sáng chế có tác dụng chống nhiễm khuẩn tốt và hoạt tính dược lý mạnh tại cùng một thời điểm, do vậy đề xuất thuốc mới nhằm điều trị các bệnh truyền nhiễm và tạo tiền đề cho việc nghiên cứu dược phẩm không đối xứng chứa carimyxin.

Các thử nghiệm *in vivo* và *in vitro* chứng minh rằng levocarimyxin theo sáng chế có độ nhạy cao và mức độ kháng thuốc thấp. Levocarimyxin không chỉ là hữu hiệu đối với *Staphylococcus aureus* kháng thuốc, mà còn có giá trị không thể ước tính được đối với các bệnh nhiễm khuẩn do vi khuẩn do sự lạm dụng thuốc kháng sinh gây ra. Ví dụ *Staphylococcus aureus* kháng methixilin (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* - MRSA), nhiễm khuẩn *Escherichia coli* do β -lactamaza phổ rộng (extended-spectrum β -lactamase-ESBL) gây ra, và các bệnh truyền nhiễm do *Clostridium difficile* (C-diff) gây ra, là tất cả các bệnh do sự lạm dụng thuốc kháng sinh và được cho là có thể kiểm soát được nhờ có sự ra đời của levocarimyxin.

Levocarimyxin còn chứa spiramycin III và các thành phần khác, trong số các hợp chất này hàm lượng của spiramycin III không lớn hơn 1,0%, và tổng hàm lượng của các thành phần khác nằm trong khoảng từ 2,0% đến 19% trọng lượng, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 2,0% đến 14,0% trọng lượng, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 2,0% đến 9,0% trọng lượng và tốt nhất là nằm trong khoảng từ 2,0% đến 4,0% trọng lượng.

Theo sáng chế, các chế phẩm khác này chứa ít nhất là 3 chất đồng đẳng được cải tiến của spiramycin.

Levocarimyxin theo sáng chế là hỗn hợp gồm các thành phần chủ yếu là isovalerylspiramycin III, II và I, trong số các hợp chất này isovalerylspiramycin III là hợp chất levoisovalerylspiramycin III ở dạng tinh thể, isovalerylspiramycin II là hợp chất levoisovalerylspiramycin II ở dạng tinh thể hoặc isovalerylspiramycin I là hợp chất levoisovalerylspiramycin I ở dạng tinh thể;

khi isovalerylspiramycin III là hợp chất ở dạng tinh thể với dạng III của levoisovalerylspiramycin, hợp chất ở dạng tinh thể này đo được bằng phổ nhiễu xạ bột tia X với tia Cu-K α có các pic đặc trưng với góc 2θ bằng 8,0°, 10,0°, 11,2°, 11,7°, 16,4°, 19,1°, 19,6°, 20,0°, 21,4°, 22,9°, 23,6° và 29,4°;

khi isovalerylspiramycin II là hợp chất ở dạng tinh thể với dạng II của levoisovalerylspiramycin, hợp chất ở dạng tinh thể này đo được bằng phổ nhiễu xạ bột tia X với tia Cu-K α có các pic đặc trưng với góc 2θ bằng 10,0°, 11,6°, 16,4°, 17,3°, 19,1°, 21,2°, 22,1°, 22,7°, 26,4°, 26,9°, 27,5° và 31,5°;

khi isovalerylspiramycin I là hợp chất ở dạng tinh thể với dạng I của levoisovalerylspiramycin, hợp chất ở dạng tinh thể này được đo bằng phổ nhiễu xạ bột tia X với tia Cu-K α có các pic đặc trưng với góc 2θ bằng 7,6°, 8,0°, 10,0°, 11,4°, 16,4°, 17,0°, 17,5°, 17,9°, 19,5°, 22,7°, 23,7° và 24,4°.

Bằng các nghiên cứu thấu đáo hơn, các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng sau khi tinh chế và tách levocarimyxin, sẽ thu được chế phẩm đơn chứa isovalerylspiramycin III, II hoặc I; kết tinh lại một trong số các chế phẩm này, và thu được hợp chất isovalerylspiramycin III, II hoặc I ở dạng tinh thể; trộn một trong số các dạng tinh thể các hợp chất với levocarimyxin để tạo ra levocarimyxin, trong đó isovalerylspiramycin III, II hoặc I là hợp chất levoisovalerylspiramycin III ở dạng tinh thể, II hoặc I. Thử nghiệm được lực học *in vivo* chứng minh rằng tác dụng dược lý của levocarimyxin, trong đó isovalerylspiramycin III, II hoặc I là levoisovalerylspiramycin III, II hoặc I ở dạng tinh thể tốt hơn nhiều tác dụng dược lý của levocarimyxin tinh khiết.

Để đạt được mục đích thứ hai của sáng chế, các giải pháp kỹ thuật sau được áp dụng:

Dược phẩm chứa levocarimyxin trong đó dược phẩm chứa levocarimyxin chứa levocarimyxin này và chất mang dược dụng.

Trong số các dược phẩm theo sáng chế, hàm lượng của levocarimyxin là lượng an toàn và hữu hiệu để điều trị bệnh và nằm trong khoảng từ 10% đến 90% trọng lượng của dược phẩm đó, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 25% đến 75% trọng lượng, và tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 40% đến 60% trọng lượng.

Thuật ngữ “lượng an toàn và hữu hiệu để điều trị bệnh” được dùng trong sáng chế có nghĩa là lượng đủ của thuốc, các hợp chất, chế phẩm, các sản phẩm hoặc dược phẩm có thể làm thuyên giảm, đảo ngược hoặc điều trị các bệnh ở người và các động vật có vú khác và mà không có làm hại nghiêm trọng đến các mô của động vật có vú.

Thuật ngữ “chất mang dược dụng” theo sáng chế được dùng để chỉ các chất mang dược thông thường trong lĩnh vực dược, ví dụ, chất pha loãng, các tá dược như nước, chất độn như tinh bột và đường mía; chất kết dính như các chất dẫn xuất xenluloza, alginat, gelatin và polyvinylpyrrolidon; chất làm ẩm như glyxerol; chất phân rã như aga, canxi cacbonat và natri bicarbonat; chất làm tăng độ hấp thu như hợp chất amoni bậc bốn; chất hoạt động bề mặt như hexadecanol; chất mang hấp phụ như cao lanh và bentonit; chất bôi trơn như bột talc, canxi stearat, Mg và polyetylen glycol. Ngoài ra, các tá dược khác như gia vị và chất làm ngọt cũng có thể được bổ sung vào dược phẩm này.

Chế phẩm theo sáng chế có thể chứa chất pha loãng, chất phân rã, chất bôi trơn, chất độn, chất kết dính, chất giữ ẩm, chất làm tăng độ hấp thu, chất hoạt động bề mặt, tá dược với lượng an toàn và hữu hiệu để điều trị bệnh hoặc chất mang thuốc thường được sử dụng với lượng an toàn và hữu hiệu để điều trị bệnh trong lĩnh vực này.

Dược phẩm chứa levocarimyxin theo sáng chế tồn tại ở dạng chế phẩm có thể sử dụng để làm thuốc, và chế phẩm này là chế phẩm lỏng, rắn, bán rắn hoặc khí.

Chế phẩm lỏng bao gồm dung dịch tiêm truyền, dung dịch, hỗn hợp, xirô, cồn thuốc hoặc keo,

Chế phẩm rắn bao gồm bột dùng để tiêm, bột đông khô nhanh dùng để tiêm, viên nén, viên nang, bột, thuốc cốm, viên tròn, chế phẩm thăng hoa hoặc màng mỏng;

Chế phẩm bán rắn bao gồm thuốc mỡ, cao dán, thuốc đạn, dịch chiết hoặc gel;

Chế phẩm dạng khí bao gồm sol khí hoặc thuốc xịt.

Dược phẩm chứa levocarimyxin theo sáng chế, trong đó hàm lượng của levocarimyxin nằm trong khoảng từ 10mg đến 1500mg cho mỗi dạng liều đơn vị, tốt hơn

là nằm trong khoảng từ 100mg đến 1000mg cho mỗi dạng liều đơn vị và tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 200mg đến 500mg cho mỗi dạng liều đơn vị. Để đạt được mục đích thứ ba của sáng chế, giải pháp sau được sử dụng:

Phương pháp điều chế levocarimyxin, bao gồm quy trình nuôi cấy, lên men và chiết, trong số các bước này bước nuôi cấy và lên men gồm: cấy chủng nấm đã tách dòng WSP-195 được tạo ra bởi gen 4"- isovaleryl transferaza chứa spiramycin trên môi trường nuôi cấy nghiêng, cấy nó trong môi trường giữ giống, sau đó cấy nó vào môi trường lên men sau khi nuôi cấy, và kiểm soát quy trình lên men bằng chất điều chỉnh độ pH. Thực hiện việc lên men ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,0 đến 9,0, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 6,0 đến 8,0, và tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 6,0 đến 7,5. Các đường cong thể hiện sự thay đổi của độ pH theo thời gian thể hiện ba pha liên tục, pha thứ nhất thỏa mãn công thức $y_1=k_1x_1+6,0$, trong đó $0,0227\leq k_1\leq 0,1364$, $0<x_1\leq 22$; pha thứ hai thỏa mãn $y_2=k_2x_2+b_2$, trong đó $-0,0735\leq k_2<0$, $6,5<b_2\leq 10,62$, $22\leq x_2\leq 56$; và pha thứ ba thỏa mãn công thức $y_3=k_3x_3+b_3$, trong đó $0<k_3\leq 0,0078$, $6,06\leq b_3<6,5$, $56\leq x_3\leq 120$.

Theo sáng chế, bằng cách điều chỉnh và tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy và điều kiện lên men, đặc biệt là bằng cách kiểm soát độ pH trong quy trình lên men bằng chất điều chỉnh độ pH, các đường cong thể hiện sự biến đổi độ pH theo thời gian thể hiện ba pha liên tục và mỗi pha lần lượt thỏa mãn công thức nhất định, do vậy thu được levocarimyxin có tính quay quang.

Theo sáng chế, quy trình lên men là then chốt, độ pH cần được theo dõi một cách thường xuyên trong toàn bộ quy trình lên men và được kiểm soát bằng cách bổ sung chất điều chỉnh độ pH vào, trong đó chất điều chỉnh độ pH là hợp chất hoặc hỗn hợp bất kỳ trong số gồm glucoza, axit xitric, axit axetic, axit clohydric, dung dịch nước amoniac, natri hydroxit hoặc kali hydroxit, tốt hơn là glucoza, axit xitric, axit axetic, dung dịch nước amoniac hoặc hỗn hợp của chúng; tốt hơn nữa là glucoza, dung dịch nước amoniac hoặc hỗn hợp của chúng.

Phương pháp điều chế theo sáng chế, trong đó bước chiết bao gồm: xử lý dịch lên men bằng nhôm sulfat để thu được phần lọc, điều chỉnh độ pH đến trị số nằm trong khoảng từ 8,5 đến 9,0, chiết bằng butyl axetat, rửa dịch chiết butyl axetat này lần lượt bằng nước không phải nước muối và dung dịch NaH_2PO_4 1%, sau đó chiết bằng nước có độ pH nằm trong khoảng từ 2,0 đến 2,5 để thu được dịch chiết trong nước, điều chỉnh độ

pH đến trị số nằm trong khoảng từ 4,5 đến 5,5, làm bay hơi và loại bỏ butyl axetat dư để thu được dịch chiết trong nước, lọc và điều chỉnh độ pH đến trị số nằm trong khoảng từ 8,5 đến 9,0, thu được chất kết tủa, rửa chất kết tủa với nước tinh khiết và sấy khô nó để thu được levocarimyxin.

Trong phương pháp điều chế theo sáng chế nêu trên, môi trường nuôi cấy nghiêng chứa bột đậu tương với lượng bằng 2%, glucoza với lượng bằng 1%, tinh bột với lượng bằng 3,0%, CaCO_3 với lượng bằng 0,5%, NaCl với lượng bằng 0,4% và aga với lượng bằng 2%.

Trong phương pháp điều chế theo sáng chế nêu trên, môi trường giữ giống chứa bột đậu tương với lượng bằng 1,5%, tinh bột với lượng bằng 3,0%, NaCl với lượng bằng 0,4%, CaCO_3 với lượng bằng 0,5%, pepton với lượng bằng 0,3% và KH_2PO_4 với lượng bằng 0,05%.

Trong phương pháp điều chế theo sáng chế nêu trên, môi trường lên men chứa glucoza với lượng bằng 0,5%, tinh bột với lượng bằng 6,0%, bột nấm men với lượng bằng 0,5%, bột cá với lượng bằng 2,0%, NH_4NO_3 với lượng bằng 0,6%, NaCl với lượng bằng 1,0%, CaCO_3 với lượng bằng 0,5%, KH_2PO_4 với lượng bằng 0,05%, MgSO_4 với lượng bằng 0,1%, dầu đậu tương với lượng bằng 0,5% và chất khử bọt với lượng bằng 0,02%.

Trong phương pháp điều chế theo sáng chế nêu trên, việc nuôi cấy trên môi trường nuôi cấy nghiêng kéo dài trong khoảng thời gian từ 8 ngày đến 15 ngày ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 28°C đến 38°C.

Trong phương pháp điều chế theo sáng chế nêu trên, việc nuôi cấy trên môi trường giữ giống kéo dài trong khoảng thời gian từ 40 giờ đến 80 giờ ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 25°C đến 30°C.

Trong phương pháp điều chế theo sáng chế nêu trên, việc lên men trong môi trường lên men kéo dài trong khoảng thời gian từ 72 giờ đến 120 giờ ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 26°C đến 30°C.

Khi levocarimyxin chứa isovalerylspiramycin I, II hoặc III ở dạng tinh thể, phương pháp điều chế này còn bao gồm các bước sau:

- a) tách và tinh chế levocarimyxin để thu được levoisovalerylspiramycin I, II hoặc III;
- b) kết tinh lại hợp chất levoisovalerylspiramycin I, II hoặc III để thu được hợp chất

levoisovalerylspiramycin I, II hoặc III dạng tinh thể;

c) loại bỏ axetonitril trong levocarimycin còn lại sau khi tách và tinh chế levoisovalerylspiramycin I, II hoặc III ở bước a) bằng cách làm bay hơi kiểu quay, sau đó chiết một lần với một lượng etyl axetat, và loại bỏ etyl axetat trong dịch chiết này bằng cách làm bay hơi kiểu quay để thu được mẫu bột nhão; hòa tan lại mẫu thu được này bằng ete dầu mỏ, và loại bỏ ete dầu mỏ bằng cách làm bay hơi kiểu quay để thu được levocarimycin;

d) trộn hợp chất levoisovalerylspiramycin I, II hoặc III dạng tinh thể thu được ở bước b) với levocarimycin thu được ở bước c) để thu được levocarimycin, trong số đó, isovalerylspiramycin I, II hoặc III là hợp chất levoisovalerylspiramycin I, II hoặc III dạng tinh thể.

Phương pháp điều chế theo sáng chế, công đoạn tách và tinh chế ở bước a) bao gồm:

Tinh chế levocarimycin thu được trong bước tách sơ bộ theo phương pháp sắc ký lỏng hiệu suất cao điều chế, chuẩn bị cột sắc ký với ODS, sử dụng dung dịch đệm axetonitril và amoni axetat làm pha động trong quá trình rửa giải theo gradien; ghi các ảnh phổ UV riêng biệt bằng cách phát hiện tia cực tím, và gom các pic đích của các hợp phần levoisovalerylspiramycin I, II hoặc III:

Sắc ký cột: cột sắc ký điều chế ODS;

Pha động: axetonitril (A), dung dịch amoni axetat 100mM (B);

Điều kiện gradien: chọn gradien tuyến tính trong thời gian từ 0 phút đến 60 phút, A nằm trong khoảng từ 25% đến 65%; và khoảng từ 61 phút đến 90 phút, A nằm trong khoảng từ 65% đến 90%;

Lưu tốc: 260ml/phút;

Thể tích phun: 10ml;

Nồng độ lấy mẫu: 0,5g/ml;

Bước sóng đo: 231nm;

Cách gom: gom bằng cách kích hoạt tia cực tím;

Gom mẫu levoisovalerylspiramycin I theo thời gian lưu 44,759 phút của levoisovalerylspiramycin I; hoặc gom mẫu isovalerylspiramycin II theo thời gian lưu

43,34 phút của isovalerylspiramyxin II; hoặc gom mẫu levoisovalerylspiramyxin III theo thời gian lưu 48,009 của levoisovalerylspiramyxin III; sau đó loại bỏ axetonitril bằng cách làm bay hơi kiểu quay, dịch chiết với etyl axetat với lượng tương đương, và loại bỏ etyl axetat trong dịch chiết này bằng cách làm bay hơi kiểu quay để thu được mẫu bột nhão; hòa tan lại mẫu thu được này bằng ete dầu mỏ, và loại bỏ ete dầu mỏ bằng cách làm bay hơi kiểu quay để thu được bột rắn màu trắng chứa levoisovalerylspiramyxin I, II hoặc III.

Phương pháp điều chế theo sáng chế, khi isovalerylspiramyxin I là levoisovalerylspiramyxin I ở dạng tinh thể, dạng tinh thể thu được bằng quy trình kết tinh lại sau: hòa tan bột rắn màu trắng chứa levoisovalerylspiramyxin I trong dung môi hỗn hợp gồm metanol tuyệt đối, rượu etylic tuyệt đối và axeton khan, sau đó bổ sung nước tinh khiết trong khi khuấy, sau đó giảm nhiệt độ đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 5°C đến 15°C trong khi khuấy liên tục, để thu được hợp chất levoisovalerylspiramyxin I ở dạng tinh thể, trong đó tỷ lệ thể tích của etyl axetat và rượu etylic tuyệt đối và axeton khan trong dung môi hỗn hợp này là 1:0,1 đến 10:0,5 đến 1, tốt hơn nếu là 1:2 đến 8:0,8 đến 1;

Trong số các giải pháp này, giải pháp kỹ thuật được ưu tiên thứ nhất để kết tinh lại levoisovalerylspiramyxin I ở dạng tinh thể là: thể tích nước tinh khiết được bổ sung vào gấp từ 2 lần đến 9 lần tổng thể tích của etyl axetat, rượu etylic tuyệt đối và axeton khan, tốt hơn là gấp từ 2,5 lần đến 7,5 lần; tốc độ bổ sung nước tinh khiết vào nằm trong khoảng từ 4ml/phút đến 10ml/phút, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 6ml/phút đến 8ml/phút.

Giải pháp kỹ thuật được ưu tiên thứ hai để kết tinh lại levoisovalerylspiramyxin I ở dạng tinh thể là: tỷ lệ thể tích của etyl axetat và rượu etylic tuyệt đối và axeton khan trong dung môi hỗn hợp này là 1:0,1 đến 10:0,5 đến 1, tốt hơn nếu là 1:2 đến 8:0,8 đến 1.

Giải pháp kỹ thuật được ưu tiên thứ ba để kết tinh lại levoisovalerylspiramyxin I ở dạng tinh thể là: tốc độ khuấy khi bổ sung nước tinh khiết vào nằm trong khoảng từ 30 vòng/phút đến 60 vòng/phút, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 45 vòng/phút đến 60 vòng/phút; sau khi nước tinh khiết được bổ sung vào, tốc độ khuấy nằm trong khoảng từ 10 vòng/phút đến 30 vòng/phút, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 10 vòng/phút đến 20 vòng/phút.

Giải pháp kỹ thuật được ưu tiên thứ tư để kết tinh lại levoisovalerylspiramyxin I ở dạng tinh thể là: sau khi nước tinh khiết được bổ sung vào, tốc độ làm mát nằm trong khoảng từ 1°C/giờ đến 3°C/giờ, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 1°C/giờ đến 1,5°C/giờ.

Khi isovalerylspiramyxin II là levoisovalerylspiramyxin II ở dạng tinh thể, thì dạng tinh thể này thu được bằng quy trình kết tinh lại sau: hòa tan bột rắn màu trắng chứa levoisovalerylspiramyxin II trong dung môi hỗn hợp gồm metanol tuyệt đối, rượu etylic tuyệt đối và axeton khan, sau đó bổ sung nước tinh khiết trong khi khuấy, sau đó giảm nhiệt độ đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 5°C đến 15°C trong khi khuấy liên tục, để thu được hợp chất levoisovalerylspiramyxin II ở dạng tinh thể, trong đó tỷ lệ thể tích giữa metanol tuyệt đối và axeton khan và rượu etylic tuyệt đối trong dung môi hỗn hợp này là 1:0,1 đến 10:0,5 đến 1, tốt hơn nếu là 1:2 đến 8:0,8 đến 1;

Trong số các giải pháp này, giải pháp kỹ thuật được ưu tiên thứ nhất để kết tinh lại levoisovalerylspiramyxin II ở dạng tinh thể là: thể tích nước tinh khiết được bổ sung vào gấp từ 2 lần đến 9 lần tổng thể tích của metanol tuyệt đối, rượu etylic tuyệt đối và axeton khan, tốt hơn là gấp từ 2,5 lần đến 7,5 lần; tốc độ bổ sung nước tinh khiết vào nằm trong khoảng từ 4ml/phút đến 10ml/phút, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 6ml/phút đến 8ml/phút.

Giải pháp kỹ thuật được ưu tiên thứ hai để kết tinh lại levoisovalerylspiramyxin II ở dạng tinh thể là: tỷ lệ thể tích giữa metanol tuyệt đối và axeton khan và rượu etylic tuyệt đối trong dung môi hỗn hợp này là 1:0,1 đến 10:0,5 đến 1, tốt hơn nếu là 1:2 đến 8:0,8 đến 1.

Giải pháp kỹ thuật được ưu tiên thứ ba để kết tinh lại levoisovalerylspiramyxin II ở dạng tinh thể là: tốc độ khuấy khi bổ sung nước tinh khiết vào nằm trong khoảng từ 30 vòng/phút đến 60 vòng/phút, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 45 vòng/phút đến 60 vòng/phút; sau khi nước tinh khiết được bổ sung vào, tốc độ khuấy nằm trong khoảng từ 10 vòng/phút đến 30 vòng/phút, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 10 vòng/phút đến 20 vòng/phút.

Giải pháp kỹ thuật được ưu tiên thứ tư để kết tinh lại levoisovalerylspiramyxin II ở dạng tinh thể là: sau khi nước tinh khiết được bổ sung vào, tốc độ làm mát nằm trong khoảng từ 1°C/giờ đến 3°C/giờ, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 1°C/giờ đến 1,5°C/giờ.

Khi isovalerylspiramyxin III là levoisovalerylspiramyxin III ở dạng tinh thể, thì hợp chất ở dạng tinh thể này thu được bằng quy trình kết tinh lại sau: hòa tan bột rắn màu trắng chứa levoisovalerylspiramyxin III trong dung môi hỗn hợp gồm metanol tuyệt đối, rượu etylic tuyệt đối và axeton khan, sau đó bổ sung nước tinh khiết trong khi khuấy, sau

đó giảm nhiệt độ đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 5°C đến 15°C trong khi khuấy liên tục, để thu được hợp chất levoisovalerylspiramycin III ở dạng tinh thể, trong đó tỷ lệ thể tích bằng metanol tuyệt đối to rượu etylic tuyệt đối to axeton khan trong dung môi hỗn hợp này là 1:0,1 đến 10:0,5 đến 1, tốt hơn nếu là 1:2 đến 8:0,8 đến 1;

Trong số các giải pháp này, giải pháp kỹ thuật được ưu tiên thứ nhất để kết tinh lại hợp chất levoisovalerylspiramycin III ở dạng tinh thể là: thể tích nước tinh khiết được bổ sung vào gấp từ 2 lần đến 9 lần tổng thể tích của metanol tuyệt đối, rượu etylic tuyệt đối và axeton khan, tốt hơn là gấp từ 2,5 lần đến 7,5 lần; tốc độ bổ sung nước tinh khiết vào nằm trong khoảng từ 4ml/phút đến 10ml/phút, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 6ml/phút đến 8ml/phút.

Giải pháp kỹ thuật được ưu tiên thứ hai để kết tinh lại hợp chất levoisovalerylspiramycin III ở dạng tinh thể là: tỷ lệ thể tích giữa metanol tuyệt đối và rượu etylic tuyệt đối và axeton khan trong dung môi hỗn hợp này là 1:0,1 đến 10:0,5 đến 1, tốt hơn nếu là 1:2 đến 8:0,8 đến 1.

Giải pháp kỹ thuật được ưu tiên thứ ba để kết tinh lại hợp chất levoisovalerylspiramycin III ở dạng tinh thể là: tốc độ khuấy khi bổ sung nước tinh khiết vào nằm trong khoảng từ 30 vòng/phút đến 60 vòng/phút, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 45 vòng/phút đến 60 vòng/phút; sau khi nước tinh khiết được bổ sung vào, tốc độ khuấy nằm trong khoảng từ 10 vòng/phút đến 30 vòng/phút, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 10 vòng/phút đến 20 vòng/phút.

Giải pháp kỹ thuật được ưu tiên thứ tư để kết tinh lại hợp chất levoisovalerylspiramycin III ở dạng tinh thể là: sau khi nước tinh khiết được bổ sung vào, tốc độ làm mát nằm trong khoảng từ 1°C/giờ đến 3°C/giờ, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 1°C/giờ đến 1,5°C/giờ.

Sáng chế còn đề xuất việc sử dụng levocarimycin hoặc dược phẩm chứa nó để bào chế thuốc nhằm điều trị các bệnh truyền nhiễm.

Theo sáng chế, các bệnh truyền nhiễm là các bệnh do việc nhiễm các vi khuẩn gram dương, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Ureaplasma urealyticum*, *Chlamydia trachomatis*, Streptococcus sinh mủ, *Micrococcus catarrhalis*, Gonococcus, *Bacillus influenzae*, Legionella hoặc vi khuẩn yếm khí gây ra.

Sáng chế còn đề xuất việc sử dụng levocarimyxin và dược phẩm chứa nó để bào chế thuốc kháng khuẩn, các vi khuẩn bao gồm *Streptococcus pneumoniae*, Streptococcus nhóm A, Streptococcus sinh mủ, Enterococcus, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Catarrhal coccus*, Gonococcus, *Bacillus influenzae*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* sinh độc tố ruột, *Escherichia coli* gây bệnh đường ruột, *Escherichia coli* xâm nhập đường ruột, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus proteus vulgaris*, Bacillus gây bệnh thương hàn, Acinetobacter, Citrobacter, *Serratia marcescens*, *S. Sonnei*, *Sh. flexneri*, *Tritirachium album*; Legionella như *Legionella pneumophila*, *Legionella gormanii*, *Legionella bozemanii*, *Legionella dumoffii*, *Legionella jordanis*, và *Legionella micdadei*; vi khuẩn yếm khí như *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides vulgatus*, *Bacteroides distasonis*, *Bacteroides prevotella*, *Prevotella asaccharolyticus*, *Prevotella oralis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Fusobacterium russii*, Bifidobacteria, Lactobacillus, Peptostreptococcus, *Propionibacterium acnes*, *Clostridium perfringens*, và nấm dạng nấm men.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ biết được rằng lượng các thành phần hoạt tính cần thiết để điều trị bệnh sẽ thay đổi theo các yếu tố khác nhau, bao gồm bản chất của bệnh và tuổi và tình trạng bệnh lý của bệnh nhân, và cuối cùng sẽ được bác sĩ xác định. Nếu dược phẩm chứa levocarimyxin theo sáng chế được dùng theo dạng liều đơn vị, thì hàm lượng của levocarimyxin nằm trong khoảng từ 10mg đến 1500mg cho mỗi dạng liều đơn vị, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 100mg đến 1000mg cho mỗi dạng liều đơn vị và tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 200mg đến 500mg cho mỗi dạng liều đơn vị. Liều lượng cần thiết hằng ngày có thể được dùng theo liều đơn hoặc dạng phân liều.

Thử nghiệm dược lực học *in vitro* chứng minh rằng các thành phần hoạt tính trong levocarimyxin hoặc dược phẩm chứa nó được đề xuất theo sáng chế có tính quay quang và tác dụng chống nhiễm khuẩn mỹ mãn. Các thành phần hoạt tính không chỉ có hoạt tính kháng khuẩn mạnh với các vi khuẩn gram dương, đặc biệt là *Staphylococcus aureus* có tính kháng erythroxin, β -lactamaza, *Streptococcus pneumoniae*, và Streptococcus sinh mủ, mà còn hữu hiệu với một số vi khuẩn gram âm như *Catarrhal coccus*, Gonococcus, *Bacillus influenzae*, một số Legionella và vi khuẩn yếm khí, đặc biệt là *Mycoplasma pneumoniae* và *Chlamydia pneumoniae*.

So sánh với tình trạng kỹ thuật, sáng chế có các ưu điểm sau:

1) Levocarimyxin theo sáng chế có tính quay quang, tuy nhiên, theo nghiên cứu dược lý hiện đại, sự khác biệt về ái lực của chất đồng phân đối ảnh của thuốc với thụ thể gây ra sự khác biệt về độ chọn lọc lập thể của chất đồng phân đối ảnh của thuốc, dẫn đến sự khác biệt đáng kể về tác dụng dược lý. Các thử nghiệm dược lực học *in vivo* và *in vitro* chứng tỏ rằng levocarimyxin theo sáng chế có tác dụng chống nhiễm khuẩn mỹ mẫn và hoạt tính dược lý mạnh đồng thời, do vậy tạo ra thuốc mới để điều trị các bệnh truyền nhiễm và tạo tiền đề để nghiên cứu và phát triển thuốc không đối xứng chứa carimyxin; thử nghiệm dược lực học *in vivo* cho thấy levocarimyxin, trong đó isovalerylspiramycin I, II hoặc III là hợp chất levoisovalerylspiramycin I, II hoặc III ở dạng tinh thể có chức năng bảo vệ tốt hơn trong tác dụng chữa bệnh trên chuột nhắt bị nhiễm 12 chủng vi khuẩn;

2) Phương pháp điều chế levocarimyxin được đề xuất theo sáng chế, bằng cách điều chỉnh và tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy và điều kiện lên men, đặc biệt là bằng cách kiểm soát độ pH trong quy trình lên men bằng chất điều chỉnh độ pH, các đường cong thể hiện sự biến đổi độ pH theo thời gian thể hiện ba pha liên tục và mỗi pha lần lượt thỏa mãn công thức nhất định, do vậy thu được levocarimyxin có tính quay quang;

3) Phương pháp điều chế levocarimyxin được đề xuất theo sáng chế, được đặc trưng bởi quy trình sản xuất được đơn giản hóa, là thích hợp cho quy trình sản xuất công nghiệp ở quy mô lớn.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Dưới đây là các ví dụ của sáng chế và các ví dụ này chỉ nhằm mục đích mô tả sáng chế, chứ không giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ 1: Điều chế levocarimyxin

1) Nuôi cấy và lên men

Cấy chủng nấm đã tách dòng WSJ-195 được tạo ra bởi gen 4"-isovaleryl transferaza chứa spiramycin trên môi trường nuôi cấy nghiêng, cấy nó trong môi trường giữ giống, sau đó ủ nó trong môi trường lên men sau khi nuôi cấy, và kiểm soát quy trình lên men này bằng glucoza và dung dịch nước amoniac. Quy trình lên men kéo dài trong thời gian 120 giờ ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,0 đến 9,0. Các đường cong thể hiện sự thay đổi của độ pH theo thời gian thể hiện ba pha liên tục, pha thứ nhất thỏa mãn công

thức $y_1=0,1364x_1+6,0$, trong đó $0 < x_1 \leq 22$; pha thứ hai thỏa mãn công thức $y_2=-0,0735x_2+10,64$, trong đó $22 \leq x_2 \leq 56$; pha thứ ba thỏa mãn công thức $y_3=0,0078x_3+6,06$, trong đó $56 \leq x_3 \leq 120$, xem Hình 1 về đường cong biến thiên, thu được dịch lên men.

2) Chiết

Xử lý dịch lên men bằng nhôm sulfat để thu được dịch lọc, điều chỉnh độ pH đến 9,0, chiết bằng butyl axetat, rửa dịch chiết butyl axetat này lần lượt bằng nước không phải nước muối và dung dịch NaH_2PO_4 1%, sau đó chiết bằng nước với độ pH=2,5 để thu được dịch chiết trong nước, điều chỉnh độ pH đến 4,5, làm bay hơi và loại bỏ butyl axetat dư để thu được dịch chiết trong nước, lọc và điều chỉnh độ pH đến 8,5, thu được chất kết tủa, rửa chất kết tủa bằng nước tinh khiết và sấy khô nó để thu được levocarimyxin.

Ví dụ 2: Điều chế levocarimyxin

1) Nuôi cấy và lên men

Cây chủng nấm đã tách dòng WSJ-195 được tạo ra bởi gen 4''-isovaleryl transferaza chứa spiramycin trên môi trường nuôi cấy nghiêng, cấy nó trong môi trường giữ giống, sau đó ủ nó trong môi trường lên men sau khi nuôi cấy, và kiểm soát quy trình lên men bằng glucoza và natri hydroxit. Quy trình lên men kéo dài trong thời gian 110 giờ ở điều kiện độ pH nằm trong khoảng từ 6,0 đến 8,0. Các đường cong thể hiện sự thay đổi của độ pH theo thời gian thể hiện ba pha liên tục, pha thứ nhất thỏa mãn công thức $y_1=0,0909x_1+6,4$, trong đó $0 < x_1 \leq 22$; pha thứ hai thỏa mãn công thức $y_2=-0,0441x_2+7,8$, trong đó $22 \leq x_2 \leq 56$; và pha thứ ba thỏa mãn công thức $y_3=0,0078x_3+6,06$, trong đó $56 \leq x_3 \leq 110$, xem Hình 2 về đường cong biến thiên, thu được dịch lên men.

2) Chiết

Xử lý dịch lên men bằng nhôm sulfat để thu được dịch lọc, điều chỉnh độ pH đến 8,9, chiết bằng butyl axetat, rửa dịch chiết butyl axetat này lần lượt bằng nước không phải nước muối và dung dịch NaH_2PO_4 1%, sau đó chiết bằng nước có độ pH=2,2 để thu được dịch chiết trong nước, điều chỉnh độ pH đến 4,2, làm bay hơi và loại bỏ butyl axetat dư để thu được dịch chiết trong nước, lọc và điều chỉnh độ pH đến 8,5, thu được chất kết tủa, rửa chất kết tủa bằng nước tinh khiết và sấy khô nó để thu được levocarimyxin.

Ví dụ 3: Điều chế levocarimyxin

1) Nuôi cấy và lên men

Nuôi cấy chủng nấm đã tách dòng WSJ-195 được tạo ra bởi gen 4''-isovaleryl transferaza chứa spiramycin trên môi trường nuôi cấy nghiêng, cấy nó vào môi trường giữ giống, sau đó cấy vào môi trường lên men sau khi nuôi cấy, và kiểm soát quy trình lên men bằng glucoza và axit xitric. Quy trình lên men kéo dài trong thời gian 115 giờ ở điều kiện độ pH nằm trong khoảng từ 6,0 đến 7,5. Các đường cong thể hiện sự thay đổi của độ pH theo thời gian thể hiện ba pha liên tục, pha thứ nhất thỏa mãn công thức $y_1 = 0,0682x_1 + 6,0$, trong đó $0 < x_1 < 22$; pha thứ hai thỏa mãn công thức $y_2 = -0,0294x_2 + 8,147$, trong đó $22 < x_2 < 56$; pha thứ ba thỏa mãn công thức $y_3 = 0,0078x_3 + 6,06$, trong đó $56 < x_3 < 115$, xem Hình 3 về đường cong biến thiên, thu được dịch lên men.

2) Chiết

Xử lý dịch lên men bằng nhôm sulfat để thu được dịch lọc, điều chỉnh độ pH đến 8,6, chiết bằng butyl axetat, rửa dịch chiết butyl axetat này lần lượt bằng nước không phải nước muối và dung dịch NaH_2PO_4 1%, sau đó chiết bằng nước có độ pH=2,3 để thu được dịch chiết trong nước, điều chỉnh độ pH đến 5,2, làm bay hơi và loại bỏ butyl axetat dư để thu được dịch chiết trong nước, lọc và điều chỉnh độ pH đến 8,7, thu được chất kết tủa, rửa chất kết tủa bằng nước tinh khiết và sấy khô nó để thu được levocarimycin.

Ví dụ 4: Điều chế levocarimycin

1) Nuôi cấy và lên men

Nuôi cấy chủng nấm đã tách dòng WSJ-195 được tạo ra bởi gen 4''-isovaleryl transferaza chứa spiramycin trên môi trường nuôi cấy nghiêng chứa bột đậu tương với lượng bằng 2%, glucoza với lượng bằng 1%, tinh bột với lượng bằng 3%, CaCO_3 với lượng bằng 0,5%, NaCl với lượng bằng 0,4% và aga với lượng bằng 2% trong thời gian 15 ngày ở nhiệt độ 28°C , cấy nó vào môi trường giữ giống chứa bột đậu tương với lượng bằng 1,5%, tinh bột với lượng bằng 3,0%, NaCl với lượng bằng 0,4%, CaCO_3 với lượng bằng 0,5%, pepton với lượng bằng 0,3% và KH_2PO_4 với lượng bằng 0,05% trong thời gian 80 giờ ở nhiệt độ 25°C , sau đó cấy vào môi trường lên men chứa glucoza với lượng bằng 0,5%, tinh bột với lượng bằng 6,0%, bột nấm men với lượng bằng 0,5%, bột cá với lượng bằng 2,0%, NH_4NO_3 với lượng bằng 0,6%, NaCl với lượng bằng 1,0%, CaCO_3 với lượng bằng 0,5%, KH_2PO_4 với lượng bằng 0,05%, MgSO_4 với lượng bằng 0,1%, dầu đậu

tương với lượng bằng 0,5% và chất khử bột với lượng bằng 0,02% với kích thước cây bằng 0,1%, và kiểm soát quy trình lên men bằng glucoza và dung dịch nước amoniac. Quy trình lên men kéo dài trong thời gian 120 giờ ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,0 đến 9,0. Các đường cong thể hiện sự thay đổi của độ pH theo thời gian thể hiện ba pha liên tục, pha thứ nhất thỏa mãn công thức $y_1=0,1364x_1+6,0$, trong đó $0 < x_1 \leq 22$; pha thứ hai thỏa mãn công thức $y_2=-0,0735x_2+10,64$, trong đó $22 \leq x_2 \leq 56$; pha thứ ba thỏa mãn công thức $y_3=0,0078x_3+6,06$, trong đó $56 \leq x_3 \leq 120$, và thu được dịch lên men.

2) Chiết

Xử lý dịch lên men bằng nhôm sulfat để thu được dịch lọc, điều chỉnh độ pH đến 8,5, chiết bằng butyl axetat, rửa dịch chiết butyl axetat này lần lượt bằng nước không phải nước muối và dung dịch NaH_2PO_4 1%, sau đó chiết bằng nước có độ pH=2,0 để thu được dịch chiết trong nước, điều chỉnh độ pH đến 4,5, làm bay hơi và loại bỏ butyl axetat dư để thu được dịch chiết trong nước, lọc và điều chỉnh độ pH đến 8,5 để thu được chất kết tủa, rửa chất kết tủa bằng nước tinh khiết sấy khô nó để thu được levocarimyxin.

Ví dụ 5: Điều chế levocarimyxin

1) Nuôi cấy và lên men

Nuôi cấy chủng nấm đã tách dòng WSJ-195 được tạo ra bởi gen 4''-isovaleryl transferaza chứa spiramycin trên môi trường nuôi cấy nghiêng chứa bột đậu tương với lượng bằng 2%, glucoza với lượng bằng 1%, tinh bột với lượng bằng 3%, CaCO_3 với lượng bằng 0,5%, NaCl với lượng bằng 0,4% và aga với lượng bằng 2% trong thời gian 8 ngày ở nhiệt độ 38°C , cấy nó vào môi trường giữ giống chứa bột đậu tương với lượng bằng 1,5%, tinh bột với lượng bằng 3,0%, NaCl với lượng bằng 0,4%, CaCO_3 với lượng bằng 0,5%, pepton với lượng bằng 0,3% và KH_2PO_4 với lượng bằng 0,05% trong thời gian 40 giờ ở nhiệt độ 30°C , sau đó cấy vào môi trường lên men chứa glucoza với lượng bằng 0,5%, tinh bột với lượng bằng 6,0%, bột nấm men với lượng bằng 0,5%, bột cá với lượng bằng 2,0%, NH_4NO_3 với lượng bằng 0,6%, NaCl với lượng bằng 1,0%, CaCO_3 với lượng bằng 0,5%, KH_2PO_4 với lượng bằng 0,05%, MgSO_4 với lượng bằng 0,1%, dầu đậu tương với lượng bằng 0,5% và chất khử bột với lượng bằng 0,02% với kích thước cây bằng 20%, và kiểm soát quy trình lên men bằng glucoza và dung dịch nước amoniac. Quy trình lên men kéo dài trong thời gian 115 giờ ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,0 đến 7,5 ở

nhệt độ 30°C. Các đường cong thể hiện sự thay đổi của độ pH theo thời gian thể hiện ba pha liên tục, pha thứ nhất thỏa mãn công thức $y_1=0,0682x_1+6,0$, trong đó $0 < x_1 \leq 22$; pha thứ hai thỏa mãn công thức $y_2=-0,0294x_2+8,147$, trong đó $22 \leq x_2 \leq 56$; pha thứ ba thỏa mãn công thức $y_3=0,0078x_3+6,06$, trong đó $56 \leq x_3 \leq 115$, xem Hình 3 về đường cong biến thiên, thu được dịch lên men.

2) Chiết

Xử lý dịch lên men bằng nhôm sulfat để thu được dịch lọc, điều chỉnh độ pH đến 9,0, chiết bằng butyl axetat, rửa dịch chiết butyl axetat này lần lượt bằng nước không phải nước muối và dung dịch NaH_2PO_4 1%, sau đó chiết bằng nước với độ pH=2,5 để thu được dịch chiết trong nước, điều chỉnh độ pH trong khoảng từ 4,5 đến 5,5, làm bay hơi và loại bỏ butyl axetat dư để thu được dịch chiết trong nước, lọc và điều chỉnh độ pH đến 9,0, thu được chất kết tủa, rửa chất kết tủa bằng nước tinh khiết và sấy khô nó để thu được levocarimyxin.

Ví dụ 6: Điều chế levocarimyxin

1) Nuôi cấy và lên men

Nuôi cấy chủng nấm đã tách dòng WSJ-195 được tạo ra bởi gen 4''-isovaleryl transferaza chứa spiramycin trên môi trường nuôi cấy nghiêng chứa bột đậu tương với lượng bằng 2%, glucoza với lượng bằng 1%, tinh bột với lượng bằng 3%, CaCO_3 với lượng bằng 0,5%, NaCl với lượng bằng 0,4% và aga với lượng bằng 2% trong thời gian 12 ngày ở nhiệt độ 30°C, cấy nó vào môi trường giữ giống chứa bột đậu tương với lượng bằng 1,5%, tinh bột với lượng bằng 3,0%, NaCl với lượng bằng 0,4%, CaCO_3 với lượng bằng 0,5%, pepton với lượng bằng 0,3% và KH_2PO_4 với lượng bằng 0,05% trong thời gian 60 giờ ở nhiệt độ 28°C, sau đó cấy vào môi trường lên men chứa glucoza với lượng bằng 0,5%, tinh bột với lượng bằng 6,0%, bột nấm men với lượng bằng 0,5%, bột cá với lượng bằng 2,0%, NH_4NO_3 với lượng bằng 0,6%, NaCl với lượng bằng 1,0%, CaCO_3 với lượng bằng 0,5%, KH_2PO_4 với lượng bằng 0,05%, MgSO_4 với lượng bằng 0,1%, dầu đậu tương với lượng bằng 0,5% và chất khử bọt với lượng bằng 0,02% với kích thước cây bằng 10%, và kiểm soát quy trình lên men bằng glucoza và dung dịch nước amoniac. Quy trình lên men kéo dài trong thời gian 90 giờ ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,0 đến 7,5 ở nhiệt độ 28°C. Các đường cong thể hiện sự thay đổi của độ pH theo thời gian thể hiện ba

pha liên tục, pha thứ nhất thỏa mãn công thức $y_1=0,0682x_1+6,0$, trong đó $0 < x_1 \leq 22$; pha thứ hai thỏa mãn công thức $y_2=-0,0294x_2+8,147$, trong đó $22 \leq x_2 \leq 56$; pha thứ ba thỏa mãn công thức $y_3=0,0078x_3+6,06$, trong đó $56 \leq x_3 \leq 90$, xem Hình 3 về đường cong biến thiên, thu được dịch lên men.

2) Chiết

Xử lý dịch lên men bằng nhôm sulfat để thu được dịch lọc, điều chỉnh độ pH đến 8,7, chiết bằng butyl axetat, rửa dịch chiết butyl axetat này lần lượt bằng nước không phải nước muối và dung dịch NaH_2PO_4 1%, sau đó chiết bằng nước có độ pH=2,2 để thu được dịch chiết trong nước, điều chỉnh độ pH đến 5,0, làm bay hơi và loại bỏ butyl axetat dư để thu được dịch chiết trong nước, lọc và điều chỉnh độ pH đến 8,7, thu được chất kết tủa, rửa chất kết tủa bằng nước tinh khiết và sấy khô nó để thu được levocarimyxin.

Ví dụ 7: Điều chế levocarimyxin

1) Nuôi cấy và lên men

Nuôi cấy chủng nấm đã tách dòng WSJ-195 được tạo ra bởi gen 4''-isovaleryl transferaza chứa spiramycin trên môi trường nuôi cấy nghiêng chứa bột đậu tương với lượng bằng 2%, glucoza với lượng bằng 1%, tinh bột với lượng bằng 3%, CaCO_3 với lượng bằng 0,5%, NaCl với lượng bằng 0,4% và aga với lượng bằng 2% trong thời gian 10 ngày ở nhiệt độ 35°C , cấy nó vào môi trường giữ giống chứa bột đậu tương với lượng bằng 1,5%, tinh bột với lượng bằng 3,0%, NaCl với lượng bằng 0,4%, CaCO_3 với lượng bằng 0,5%, pepton với lượng bằng 0,3% và KH_2PO_4 với lượng bằng 0,05% trong thời gian 55 giờ ở nhiệt độ 26°C , sau đó cấy vào môi trường lên men chứa glucoza với lượng bằng 0,5%, tinh bột với lượng bằng 6,0%, bột nấm men với lượng bằng 0,5%, bột cá với lượng bằng 2,0%, NH_4NO_3 với lượng bằng 0,6%, NaCl với lượng bằng 1,0%, CaCO_3 với lượng bằng 0,5%, KH_2PO_4 với lượng bằng 0,05%, MgSO_4 với lượng bằng 0,1%, dầu đậu tương với lượng bằng 0,5% và chất khử bọt với lượng bằng 0,02% với kích thước cây bằng 15%, và kiểm soát quy trình lên men bằng glucoza và dung dịch nước amoniac. Quy trình lên men kéo dài trong thời gian 115 giờ ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,0 đến 7,5 ở nhiệt độ 27°C . Các đường cong thể hiện sự thay đổi của độ pH theo thời gian thể hiện ba pha liên tục, pha thứ nhất thỏa mãn công thức $y_1=0,0682x_1+6,0$, trong đó $0 < x_1 \leq 22$; pha thứ hai thỏa mãn công thức $y_2=-0,0294x_2+8,147$, trong đó $22 \leq x_2 \leq 56$; pha thứ ba thỏa mãn

công thức $y_3=0,0078x_3+6,06$, trong đó $56 \leq x_3 \leq 110$, xem Hình 3 về đường cong biến thiên, thu được dịch lên men.

2) Chiết

Xử lý dịch lên men bằng nhôm sulfat để thu được dịch lọc, điều chỉnh độ pH đến 8,6, chiết bằng butyl axetat, rửa dịch chiết butyl axetat này lần lượt bằng nước không phải nước muối và dung dịch NaH_2PO_4 1%, sau đó chiết bằng nước có độ pH=2,3 để thu được dịch chiết trong nước, điều chỉnh độ pH đến 4,8, làm bay hơi và loại bỏ butyl axetat dư để thu được dịch chiết trong nước, lọc và điều chỉnh độ pH đến 8,8, thu được chất kết tủa, rửa chất kết tủa bằng nước tinh khiết và sấy khô nó để thu được levocarimyxin.

Ví dụ 8: Điều chế levocarimyxin

1) Nuôi cấy và lên men

Nuôi cấy chủng nấm đã tách dòng WSJ-195 được tạo ra bởi gen 4''-isovaleryl transferaza chứa spiramycin trên môi trường nuôi cấy nghiêng chứa bột đậu tương với lượng bằng 2%, glucoza với lượng bằng 1%, tinh bột với lượng bằng 3%, CaCO_3 với lượng bằng 0,5%, NaCl với lượng bằng 0,4% và aga với lượng bằng 2% trong thời gian 13 ngày ở nhiệt độ 36°C , cấy nó vào môi trường giữ giống chứa bột đậu tương với lượng bằng 1,5%, tinh bột với lượng bằng 3,0%, NaCl với lượng bằng 0,4%, CaCO_3 với lượng bằng 0,5%, pepton với lượng bằng 0,3% và KH_2PO_4 với lượng bằng 0,05%, trong thời gian 75 giờ ở nhiệt độ 27°C , sau đó cấy vào môi trường lên men chứa glucoza với lượng bằng 0,5%, tinh bột với lượng bằng 6,0%, bột nấm men với lượng bằng 0,5%, bột cá với lượng bằng 2,0%, NH_4NO_3 với lượng bằng 0,6%, NaCl với lượng bằng 1,0%, CaCO_3 với lượng bằng 0,5%, KH_2PO_4 với lượng bằng 0,05%, MgSO_4 với lượng bằng 0,1%, dầu đậu tương với lượng bằng 0,5% và chất khử bọt với lượng bằng 0,02% với kích thước cấy bằng 0,5%, và kiểm soát quy trình lên men bằng glucoza và dung dịch nước amoniac. Quy trình lên men kéo dài 98 giờ ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,0 đến 8,0 ở nhiệt độ 29°C . Các đường cong thể hiện sự thay đổi của độ pH theo thời gian thể hiện ba pha liên tục, pha thứ nhất thỏa mãn công thức $y_1=0,0909x_1+6,4$, trong đó $0 < x_1 \leq 22$; pha thứ hai thỏa mãn công thức $y_2=-0,0441x_2+7,8$, trong đó $22 \leq x_2 \leq 56$; pha thứ ba thỏa mãn công thức $y_3=0,0078x_3+6,06$, trong đó $56 \leq x_3 \leq 110$, xem Hình 2 về đường cong biến thiên, thu được dịch lên men.

2) Chiết

Xử lý dịch lên men bằng nhôm sulfat để thu được dịch lọc, điều chỉnh độ pH đến 8,9, chiết bằng butyl axetat, rửa dịch chiết butyl axetat này lần lượt bằng nước không phải nước muối và dung dịch NaH_2PO_4 1%, sau đó chiết bằng nước có độ pH=2,4 để thu được dịch chiết trong nước, điều chỉnh độ pH đến 4,6, làm bay hơi và loại bỏ butyl axetat dư để thu được dịch chiết trong nước, lọc và điều chỉnh độ pH đến 8,6 để thu được chất kết tủa, rửa chất kết tủa bằng nước tinh khiết và sấy khô nó để thu được levocarimyxin.

Ví dụ 9: Phương pháp xác định định lượng levocarimyxin bằng phép sắc ký lỏng hiệu suất cao

Xác định theo phương pháp sắc ký lỏng hiệu suất cao (Phụ lục V D của Dược điển Trung Quốc 2005 (2))

Sử dụng cột sắc ký Venusil XBP C18 (L) 150Å (200mmx4,6mm, 5 μ m) (do AGELA TECHNOLOGY cung cấp), pha động A là axetonitril, pha động B là dung dịch amoni axetat 0,01 mol.l⁻¹ (điều chỉnh độ pH đến 7,0 bằng dung dịch nước amoniac), gradien rửa giải theo bảng sau; bước sóng bằng 232nm, lưu lượng bằng 1,0ml.phút⁻¹, nhiệt độ cột bằng 25°C và thể tích phun bằng 20 μ l.

Thời gian (phút)	Pha động A(%)	Pha động B (%)
0	35	65
15	50	50
50	65	35
51	35	65
70	35	65

Điều kiện và hệ sắc ký thích hợp cho thử nghiệm có thể xem biểu đồ sắc ký lỏng của hợp phần carimyxin tiêu chuẩn (Hình 4). Việc điều chỉnh điều kiện sắc ký và, nếu cần, thay đổi điều kiện rửa giải theo gradien của pha động làm cho mẫu hợp phần levocarimyxin phù hợp với phổ của hợp phần carimyxin tiêu chuẩn (Hình 4).

Dung dịch của mẫu chuẩn: cân lượng thích hợp của sản phẩm tiêu chuẩn một cách chính xác, pha loãng nó bằng hỗn hợp dung dịch gồm dung dịch amoni axetat 0,01mol/l (điều chỉnh trị số độ pH đến 7,0 bằng dung dịch nước amoniac) và axetonitril với tỷ lệ bằng 65:35 đến nồng độ nằm trong khoảng từ 0,4mg/ml đến 0,6mg/ml làm dung dịch của mẫu chuẩn và lắc kỹ để sử dụng tiếp. Dung dịch mẫu thử nghiệm: cân 50mg mẫu thử

nghiệm, pha loãng nó bằng hỗn hợp dung dịch gồm dung dịch amoni axetat 0,01mol/l (điều chỉnh trị số độ pH đến 7,0 bằng dung dịch nước amoniac) và axetonitril (tỷ lệ bằng 65:35) đến 50ml làm dung dịch của sản phẩm mẫu và lắc kỹ để sử dụng tiếp theo.

Tính toán dựa trên diện tích pic của isovalerylspiramyxin III theo phương pháp ngoại chuẩn. Hàm lượng isovalerylspiramyxin III không nhỏ hơn 30%, hàm lượng isovalerylspiramyxin (I+II+III) không nhỏ hơn 60%; tổng hàm lượng của 9 thành phần spiramyxin axyl hóa không nhỏ hơn 80%, lượng spiramyxin III không lớn hơn 1,0% và tổng hàm lượng của các hợp phần không xác định được không lớn hơn 5,0%. Công thức tính được thể hiện như sau:

$$\text{Isovalerylspiramyxin III (\%)} = A_{\text{isovaleryl III}} \times W_S \times P / (A_S \times W_T) \times 100\%$$

$$\text{Isovalerylspiramyxin (I+II+III) (\%)} = (A_{\text{isovaleryl I}} + A_{\text{isovaleryl II}} + A_{\text{isovaleryl III}}) \times W_S \times P / (A_S \times W_T) \times 100\%$$

$$\text{Tổng hàm lượng của spiramyxin axyl hóa (\%)} = (A_{\text{axetyl II}} + A_{\text{axetyl III}} + A_{\text{propionyl II}} + A_{\text{propionyl III}} + A_{\text{isobutyryl II}} + A_{\text{isovaleryl I}} + A_{\text{isobutyryl III}} + A_{\text{isovaleryl II}} + A_{\text{isovaleryl III}}) \times W_S \times P / (A_S \times W_T) \times 100\%$$

$$\text{Spiramyxin III (\%)} = A_{\text{spiral III}} \times W_S \times P / (A_S \times W_T) \times 100\%$$

$$\text{Các hợp phần không xác định (\%)} = A_W \times W_S \times P / (A_S \times W_T) \times 100\%$$

trong đó:

W_S —trọng lượng của mẫu chuẩn, g;

A_S —diện tích pic của isovalerylspiramyxin III trong mẫu chuẩn;

W_T —trọng lượng của mẫu thử nghiệm, g;

A_W — tổng diện tích pic của các thành phần không xác định trong mẫu thử nghiệm;

P — độ tinh khiết của isovalerylspiramyxin III trong mẫu thử nghiệm.

Ví dụ 10: Phát hiện hợp phần levocarimyxin bằng phép sắc ký lỏng hiệu suất cao

Chiết tám nhóm dịch lên men của levocarimyxin được lên men bằng quy trình chiết levocarimyxin được nêu trong Ví dụ 4 và phương pháp phát hiện định lượng bằng phép sắc ký lỏng hiệu suất cao được nêu trong Ví dụ 9, các điều kiện phát hiện của phép sắc ký lỏng hiệu suất cao của mỗi hợp phần thu được được thể hiện trong Bảng 1 và biểu đồ sắc ký lỏng được thể hiện trên Hình 5.

Bảng 1. Các điều kiện phát hiện của phép sắc ký lỏng hiệu suất cao của tám nhóm hợp phần levocarimyxin

Hàm lượng phần trăm %	1	2	3	4	5	6	7	8	Trị số trung bình
isv-III	35,71	34,40	34,80	32,19	35,71	35,80	35,59	35,44	34,96
isv-II	24,67	24,93	24,36	24,85	20,02	23,91	23,87	23,76	23,80
isv-I	2,30	2,94	4,07	3,18	3,46	2,90	3,40	3,00	3,16
bu-III	3,56	2,75	3,54	3,50	3,50	3,90	4,10	4,00	3,61
ibu-III	-	-	-	-	-	-	-	-	-
bu-II	0,99	1,00		1,15	1,07	1,20	1,30	1,20	0,99
Ibu-II	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pr-III	7,91	8,09	7,65	8,19	8,24	8,40	8,70	8,50	8,21
pr-II	2,91	2,65	3,07	3,72	3,90	5,40	5,11	5,36	4,02
ac-III	1,50	1,19	1,07	0,96	1,14	1,36	1,68	1,29	1,27
ac-II	2,84	2,92	3,05	3,08	3,47	1,89	3,18	3,09	2,94
Tổng isv	62,68	62,27	63,23	60,22	59,19	62,61	62,86	62,20	61,91
Tổng axyl hóa	82,39	80,87	81,61	80,82	80,51	84,76	86,93	85,64	82,94

Việc phát hiện như trên cũng được tiến hành đối với levocarimyxin được bào chế trong các ví dụ khác trong sáng chế và biểu đồ sắc ký lỏng thu được là như được thể hiện trên Hình 5.

Ví dụ 11: Xác định của độ quay riêng của levocarimyxin

Cân một cách chính xác lượng thích hợp của levocarimyxin được bào chế trong các ví dụ của sáng chế, bổ sung clorofom vào để hòa tan và pha loãng thành dung dịch chứa 0,02g/ml clorofom, và xác định độ quay riêng bằng dòng D (589,3nm) của phổ natri với chiều dài xác định bằng 1dm, nhiệt độ xác định bằng 25°C, thiết bị đo độ phân cực có số ghi đến 0,0001° sau khi được hiệu chỉnh.

Bảng 2. Kết quả nghiên cứu độ quay riêng

Ví dụ số	1	2	3	4	5	6	7	8
$[\alpha]^{25}$	-52°	-55,2°	-57°	-56°	-54°	-55,3°	55,1°	55,4°

Ví dụ 12: Viên nén chứa Levocarimyxin (tính cho 10000 viên nén)

Công thức:	Bột levocarimyxin thô được cung cấp trong Ví dụ 4	1000g
	Hydroxy propyl xenluloza được thể ở mức thấp (5%)	92,5g
	Tinh bột natri carboxymetyl (3%)	55,5g
	Magie stearat (1%)	18,5g
	Tinh bột	Tổng trọng lượng - trọng lượng của các tá dược thô khác
	Tổng trọng lượng	1850g

Quy trình bào chế: Cân lượng thích hợp của tinh bột, pha loãng nó đến nồng độ bằng 15%, đun nóng nó thành hồ, và tạo thành chất kết dính; cho nguyên liệu chủ yếu carimyxin, các tá dược như tinh bột, hydroxy propyl xenluloza được thể ở mức thấp, tinh bột natri carboxymetyl và magie stearat lần lượt đi qua rây có cỡ lỗ 100, và cân các nguyên liệu chủ yếu và các tá dược yêu cầu theo công thức; sau khi trộn carimyxin, tinh bột, hydroxy propyl xenluloza được thể ở mức thấp một cách đồng nhất, bổ sung hồ tinh bột vào với nồng độ 15% tinh bột để tạo ra nguyên liệu mềm, tạo hạt bằng rây có cỡ lỗ 14, sấy khô ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 50°C đến 60°C, kiểm soát độ ẩm nằm trong khoảng từ 3% đến 5%, làm thẳng hạt bằng rây có cỡ lỗ 14, bổ sung tinh bột natri carboxymetyl, magie stearat vào và trộn, sau đó xác định hàm lượng của hạt; tính trọng lượng của mỗi viên nén theo hàm lượng của hạt, viên nén (máy dập viên đường kính 9mm), phát hiện sự khác biệt về trọng lượng của viên nén; đóng gói các viên nén đạt yêu cầu sau khi kiểm tra.

Ví dụ 13: Viên nang chứa levocarimyxin (tính cho 10000 viên nang)

Công thức:	Bột levocarimyxin thô trong Ví dụ 4	1000g
	Tinh bột (để làm thuốc)	1080-trọng lượng của bột carimyxin thô
	Vỏ nang làm thuốc loại số 3	1000 vỏ nang
	Parafin lỏng	50ml

Quy trình bào chế: Lần lượt cân nguyên liệu chủ yếu carimyxin và tinh bột dùng trong dược phẩm làm tá dược theo công thức bào chế, cho vào máy khuấy để trộn kỹ trong thời gian kéo dài từ 1,5 giờ đến 2 giờ; dữ liệu thu được của hàm lượng mẫu được thử nghiệm về cơ bản phải phù hợp với dữ liệu lý thuyết (trọng lượng của mỗi viên nang bằng

khoảng 0,105g), lần lượt cho vỏ nang làm thuốc loại số 3 đạt chất lượng và các nguyên liệu thô đã trộn kỹ vào máy nhồi theo yêu cầu vận hành của máy nhồi viên nang tự động, kiểm tra sự khác biệt của các viên nang đã được nhồi (trong khoảng $\pm 10\%$, $< 0,3\text{g}$), và độ hòa tan phải đáp ứng yêu cầu; cho các viên nang đạt chất lượng vào máy đánh bóng và bổ sung parafin lỏng vào để thực hiện việc đánh bóng trong thời gian từ 15 phút đến 20 phút, và sau đó lấy viên nang ra và kiểm tra các hộp đóng gói thành phẩm.

Ví dụ 14: Viên nén bao đường chứa levocarimyxin (tính cho 10000 viên nén)

Công thức: Giống như Ví dụ 12

Quy trình bào chế: Thực hiện phương pháp giống như trong Ví dụ 12, cho viên nén trần đảm bảo chất lượng vào chậu bao đường, từ từ cho xirô đã điều chế (nồng độ nằm trong khoảng từ 65% đến 70%) vào chậu này, và sau đó tăng nhiệt độ đến khoảng 40°C , bổ sung bột talc vào với lượng thích hợp, và thực hiện việc sấy khô bằng không khí trong thời gian từ 20 phút đến 30 phút; sau khi các viên nén có được lớp bao phủ bằng cách lặp lại các bước nêu trên vài lần, thực hiện việc bao đường trong thời gian từ 15 phút đến 20 phút; sau khi viên nén được bao đường, cho bột màu đặc đã điều chế vào xirô và trộn đều, và sau đó rót nó vào chậu và trộn trong thời gian từ 15 phút đến 20 phút mỗi lần để thu được viên nén bao đường.

Ví dụ 15: Xirô khô chứa levocarimyxin (tính cho 10000 túi)

Công thức:	Bột levocarimyxin thô trong Ví dụ 4	1250g
	Axit xitric (0,5%) (xitrat)	15g
	Sucroza	Tổng trọng lượng-trọng lượng của các tá dược khác
	Tổng trọng lượng	500g
	Bột màu (curcumin)	khoảng 1g

Quy trình bào chế: Lần lượt nghiền bột carimyxin thô, axit xitric, sucroza bằng máy nghiền bằng dòng khí với tốc độ cao thành bột theo cách sao cho 85% các bột này có thể đi qua rây có cỡ lỗ 300, và 15% đi qua rây có cỡ lỗ 180, lần lượt cân bột mịn đã được nghiền với lượng thích hợp theo công thức và sau đó trộn kỹ chúng trong thời gian từ 1 giờ đến 1,5 giờ; xác định hàm lượng của nó, tính thể tích đóng gói (hàm lượng đóng gói mỗi túi theo lý thuyết là 500mg), và sau đó cho hỗn hợp này vào máy tạo hình-nhồi-bị

kín, và đóng gói chúng bằng giấy tráng nhôm. Đóng gói sản phẩm theo yêu cầu vận hành của máy đóng gói, với mức chênh lệch về hàm lượng đóng gói giới hạn trong khoảng $\pm 5\%$, kiểm tra sau khi đóng gói, và sau đó thực hiện quy trình đóng gói đối với phần đạt chất lượng.

Ví dụ 16: Viên nén bao tan trong ruột chứa levocarimyxin (tính cho 10000 viên nén)

Công thức: Xem Ví dụ 12.

Quy trình bào chế: bào chế viên nén trần theo Ví dụ 12; cho các viên nén trần đạt yêu cầu vào chậu bao đường, sử dụng xirô và bột talc với lượng nằm trong khoảng từ 60% đến 70% để bao ba lớp bao nền và sau đó bao lớp riêng biệt, bổ sung dung dịch rượu zein 10%, sấy khô trong thời gian từ 10 phút đến 15 phút theo phương pháp đảo, và sau đó nhỏ giọt dietyl phtalat, axeton, xenluloza axetat phtalat và dung dịch rượu, tức là dung dịch bao tan trong ruột vào chậu này và sấy khô từ 2 đến 3 lần và trong thời gian từ 10 đến 15 phút một lần theo phương pháp đảo; sau khi qua quy trình kiểm tra chất lượng, thực hiện việc bao đường theo Ví dụ 7.

Ví dụ 17: Viên nén bao tan trong dạ dày chứa levocarimyxin (tính cho 10000 viên nén)

Công thức: Xem Ví dụ 12.

Quy trình bào chế: bào chế viên nén trần theo Ví dụ 12; cho các viên nén trần đạt yêu cầu vào máy bao hiệu suất cao và sau đó bào chế bột bao đủ chất lượng (bao gồm tan được trong chất béo và tan được trong nước) thành dung dịch bao theo yêu cầu và sau đó cho dung dịch bao này vào keo để nghiền và lọc để sử dụng. Đun nóng sơ bộ chậu bao hiệu suất cao chứa đầy viên nén trần, với tốc độ quay kiểm soát được nằm trong khoảng từ 5 vòng/phút đến 10 vòng/phút và nhiệt độ nằm trong khoảng từ 45°C đến 60°C, phun dung dịch bao vào chậu này với thiết bị phun dạng sol khí (cỡ lỗ > 300) và sấy khô trong thời gian từ 25 đến 35 phút, thực hiện quy trình lặp lại từ 8 đến 12 lần, cho đến khi lớp bao trở nên đồng nhất, và cuối cùng đóng gói các viên nén đạt yêu cầu sau khi sấy khô.

Ví dụ 18: Thuốc cốm chứa levocarimyxin (tính cho 10000 túi)

Công thức:	Bột levocarimyxin thô trong Ví dụ 5	1250g
	Đường bột	20000g
	Dextrin	9000g

PVP-K30 5%

lượng thích hợp

Quy trình bào chế: rây bột carimyxin thô, đường bột và dextrin bằng rây có cỡ lỗ 120, cân bột carimyxin thô, đường bột và dextrin theo công thức và trộn chúng một cách đồng nhất; chuyển các nguyên liệu đã trộn đều nêu trên thành nguyên liệu mềm với dịch nhầy PVP-K30 5%; bào chế nguyên liệu thành hạt với máy tạo hạt dạng dao động, sấy khô ở nhiệt độ 70°C, duỗi thẳng hạt, và sau đó đóng gói chúng sau khi kiểm tra chất lượng.

Ví dụ 19: Bột dùng để tiêm sấy khô ở nhiệt độ thấp chứa levocarimyxin

Cân 500mg bột levocarimyxin thô được bào chế trong Ví dụ 6, trộn nó với axit adipic với lượng mol bằng nhau, và sau đó hòa tan vào 5ml nước để thu được dung dịch trong suốt màu vàng nhạt, có độ pH nằm trong khoảng từ 4,6 đến 5,6. Bổ sung 40mg manitol làm cát nhân tạo đã được sấy khô ở nhiệt độ thấp, làm đông lạnh nhanh trong thời gian 9 giờ ở nhiệt độ thấp, và sấy khô ở nhiệt độ thấp để thu được bột nhão màu vàng nhạt. Hòa tan nó với 10ml nước tiệt trùng trước khi sử dụng.

Ví dụ 20: Bột dùng để tiêm sấy khô ở nhiệt độ thấp chứa levocarimyxin

Cân 500mg bột levocarimyxin thô được bào chế trong Ví dụ 4, trộn nó với axit citric với lượng mol bằng nhau, và sau đó hòa tan vào 5ml nước để thu được dung dịch trong suốt màu vàng nhạt, với độ pH nằm trong khoảng từ 4,6 đến 5,6. Bổ sung 40mg manitol làm cát nhân tạo đã được sấy khô ở nhiệt độ thấp, làm đông lạnh nhanh trong thời gian 9 giờ ở nhiệt độ thấp, và sấy khô ở nhiệt độ thấp để thu được bột nhão màu vàng nhạt. Hòa tan nó với 10ml nước tiệt trùng trước khi sử dụng.

Ví dụ 21: Bột dùng để tiêm sấy khô ở nhiệt độ thấp chứa levocarimyxin

Cân 500mg bột levocarimyxin thô được bào chế trong Ví dụ 5, trộn nó với axit maleic với lượng mol bằng nhau, và sau đó hòa tan vào 5ml nước để thu được dung dịch trong suốt màu vàng nhạt, với độ pH nằm trong khoảng từ 4,6 đến 5,6. Bổ sung 40mg manitol làm cát nhân tạo đã được sấy khô ở nhiệt độ thấp, làm đông lạnh nhanh trong thời gian 9 giờ ở nhiệt độ thấp, và sấy khô ở nhiệt độ thấp để thu được bột nhão màu vàng nhạt. Hòa tan nó với 10ml nước tiệt trùng trước khi sử dụng.

Ví dụ 22: Điều chế levocarimyxin trong đó isovalerylspiramycin I là hợp chất levoisovalerylspiramycin I ở dạng tinh thể

Tách và tinh chế levocarimyxin thu được theo Ví dụ 1.

Tinh chế levoisovalerylspiramycin I: Tinh chế mẫu thu được trong bước tách sơ bộ theo phương pháp sắc ký lỏng hiệu suất cao điều chế, chuẩn bị cột sắc ký với ODS, sử dụng dung dịch đệm axetonitril và amoni axetat làm pha động trong quá trình rửa giải theo gradien; ghi các ảnh phổ UV riêng biệt bằng cách phát hiện tia cực tím, và gom các pic đích của các thành phần levoisovalerylspiramycin I:

Sắc ký cột: Sắc ký cột ODS điều chế;

Pha động: Axetonitril (A), dung dịch amoni axetat 100mM (B);

Điều kiện gradien: chọn gradien tuyến tính trong thời gian từ 0 phút đến 60 phút, A nằm trong khoảng từ 25% đến 65%, và từ 61 phút đến 90 phút, A nằm trong khoảng từ 65% đến 90%;

Lưu tốc: 260ml/phút;

Thể tích phun: 10ml;

Nồng độ lấy mẫu: 0,5g/ml;

Bước sóng đo: 231nm;

Cách gom: gom bằng cách kích hoạt tia cực tím;

Gom mẫu levoisovalerylspiramycin I theo thời gian lưu (RT) bằng 44,759 phút của levoisovalerylspiramycin I, sau đó loại bỏ axetonitril bằng cách làm bay hơi kiểu quay, chiết một lần với một lượng etyl axetat, và loại bỏ etyl axetat trong dịch chiết này bằng cách làm bay hơi kiểu quay để thu được mẫu bột nhão; hòa tan lại mẫu bột nhão bằng ete dầu mỏ, và loại bỏ ete dầu mỏ bằng cách làm bay hơi kiểu quay để thu được bột rắn màu trắng chứa levoisovalerylspiramycin I.

Kết tinh lại tiếp bột levoisovalerylspiramycin I rắn màu trắng để thu được hợp chất ở dạng tinh thể. Phương pháp kết tinh lại như sau:

(1) Hòa tan hợp chất levoisovalerylspiramycin I rắn thu được theo Ví dụ 1 trong dung môi hỗn hợp gồm etyl axetat, rượu etylic tuyệt đối và axeton khan, theo tỷ lệ thể tích giữa etyl axetat và rượu etylic tuyệt đối và axeton khan trong dung môi hỗn hợp này bằng 1:10:1;

(2) Sau đó bổ sung nước tinh khiết vào và đồng thời khuấy hỗn hợp này, và thể tích

nước tinh khiết được bổ sung vào bằng 2,5 lần tổng thể tích của etyl axetat, rượu etylic tuyệt đối và axeton khan; lưu tốc của nước được bổ sung vào bằng 4ml/phút; và tốc độ khuấy khi bổ sung nước tinh khiết vào bằng 30 vòng/phút;

(3) Làm mát đến 5°C với tốc độ 1°C/giờ sau khi bổ sung nước tinh khiết vào, tiếp tục khuấy với tốc độ 10 vòng/phút trong khi làm lạnh, để thu được hợp chất levoisovalerylspiramycin I ở dạng tinh thể.

Phổ nhiễu xạ bột tia X của hợp chất levoisovalerylspiramycin I ở dạng tinh thể đo được bằng tia X Cu-K α có các pic đặc trưng với góc 2 θ bằng 7,6°, 8,0°, 10,0°, 11,4°, 16,4°, 17,0°, 17,5°, 17,9°, 19,5°, 22,7°, 23,7° và 24,4°, và phổ nhiễu xạ bột tia X là như được thể hiện trên Hình 6.

Loại bỏ axetonitril trong levocarimycin còn lại sau khi tách và tinh chế các hợp phần levoisovalerylspiramycin I bằng cách làm bay hơi kiểu quay, sau đó chiết một lần với một lượng etyl axetat, và loại bỏ etyl axetat trong dịch chiết này bằng cách làm bay hơi kiểu quay để thu được mẫu bột nhão; hòa tan lại mẫu bột nhão bằng ete dầu mỏ, và loại bỏ ete dầu mỏ bằng cách làm bay hơi kiểu quay để thu được levocarimycin; sau đó trộn levocarimycin với hợp chất levoisovalerylspiramycin I ở dạng tinh thể nêu trên để thu được levocarimycin, trong đó isovalerylspiramycin I là hợp chất levoisovalerylspiramycin I ở dạng tinh thể.

Ví dụ 23: Điều chế levocarimycin trong đó isovalerylspiramycin I là hợp chất levoisovalerylspiramycin I ở dạng tinh thể

Ngoài các bước giống với các bước trong Ví dụ 22, sự khác biệt về phương pháp kết tinh lại là như sau:

(1) Hòa tan hợp chất levoisovalerylspiramycin I rắn trong dung môi hỗn hợp gồm etyl axetat, rượu etylic tuyệt đối và axeton khan, theo tỷ lệ thể tích giữa etyl axetat và rượu etylic tuyệt đối và axeton khan trong dung môi hỗn hợp này bằng 1:10:1;

(2) Sau đó bổ sung nước tinh khiết vào và đồng thời khuấy hỗn hợp này, và thể tích nước tinh khiết được bổ sung vào bằng 9 lần tổng thể tích của etyl axetat, rượu etylic tuyệt đối và axeton khan; lưu tốc của nước được bổ sung vào bằng 10ml/phút; và tốc độ khuấy khi bổ sung nước tinh khiết vào bằng 60 vòng/phút;

(3) làm mát đến 15°C với tốc độ 3°C/giờ sau khi bổ sung nước tinh khiết vào, và

tiếp tục khuấy với tốc độ 10 vòng/phút trong khi làm mát, để thu được hợp chất levoisovalerylsipramyxin I ở dạng tinh thể.

Phổ nhiễu xạ bột tia X của hợp chất levoisovalerylsipramyxin I ở dạng tinh thể đo được bằng tia Cu-K α là giống như phổ được thể hiện trên Hình 6.

Ví dụ 24: Điều chế levocarimyxin trong đó isovalerylsipramyxin I là hợp chất levoisovalerylsipramyxin I ở dạng tinh thể

Các bước thao tác khác là giống với Ví dụ 22. Điểm khác biệt là bước kết tinh lại, như sau:

1. Đầu tiên, hòa tan hợp chất levoisovalerylsipramyxin I rắn trong dung môi hỗn hợp gồm etyl axetat, rượu etylic tuyệt đối, và axeton khan với tỷ lệ thể tích giữa etyl axetat và rượu etylic tuyệt đối và axeton khan trong dung môi hỗn hợp này bằng 1:5:0,8;
2. Sau đó bổ sung nước tinh khiết vào và đồng thời khuấy hỗn hợp này, và thể tích nước tinh khiết được bổ sung vào gấp 7,5 lần tổng thể tích của etyl axetat, rượu etylic tuyệt đối, và axeton khan; lưu tốc của nước được bổ sung vào bằng 6ml/phút; và tốc độ khuấy khi bổ sung nước tinh khiết vào bằng 40 vòng/phút;
3. Làm mát xuống 10°C với tốc độ 2°C/giờ sau khi bổ sung nước tinh khiết vào, và tiếp tục khuấy với tốc độ 15 vòng/phút trong khi làm mát, để thu được hợp chất levoisovalerylsipramyxin I ở dạng tinh thể. Tiến hành đo bằng tia Cu-K α , phổ nhiễu xạ bột tia X của hợp chất levoisovalerylsipramyxin I ở dạng tinh thể là giống phổ được thể hiện trên Hình 6.

Ví dụ 25: Điều chế levocarimyxin trong đó isovalerylsipramyxin I là hợp chất levoisovalerylsipramyxin I ở dạng tinh thể

Các bước thao tác khác là giống với Ví dụ 22. Điểm khác biệt là bước kết tinh lại, như sau:

- (1) Đầu tiên, hòa tan hợp chất levoisovalerylsipramyxin I rắn trong dung môi hỗn hợp gồm etyl axetat, rượu etylic tuyệt đối, và axeton khan với tỷ lệ thể tích giữa etyl axetat và rượu etylic tuyệt đối và axeton khan trong dung môi hỗn hợp này bằng 1:2:1;
- (2) Sau đó bổ sung nước tinh khiết vào và đồng thời khuấy hỗn hợp này, và thể tích nước tinh khiết được bổ sung vào gấp 7,5 lần tổng thể tích của etyl axetat, rượu etylic tuyệt đối,

và axeton khan; lưu tốc của nước được bổ sung vào bằng 8ml/phút; và tốc độ khuấy khi bổ sung nước tinh khiết vào là 45 vòng/phút;

(3) làm mát đến 12°C với tốc độ 2,5°C/giờ sau khi bổ sung nước tinh khiết vào, và tiếp tục khuấy với tốc độ 20 vòng/phút trong khi làm mát, để thu được hợp chất levoisovalerylspiramyxin I ở dạng tinh thể. Tiến hành đo bằng tia Cu-K α , phổ nhiễu xạ bột tia X phổ của hợp chất levoisovalerylspiramyxin I ở dạng tinh thể là giống Hình 6.

Ví dụ 26: Điều chế levocarimyxin trong đó isovalerylspiramyxin I là hợp chất levoisovalerylspiramyxin I ở dạng tinh thể

Các bước thao tác khác là giống với Ví dụ 22. Điểm khác biệt là bước kết tinh lại, như sau:

(1) Đầu tiên, hòa tan hợp chất rắn của levoisovalerylspiramyxin I trong dung môi hỗn hợp gồm etyl axetat, rượu etylic tuyệt đối, và axeton khan với tỷ lệ thể tích giữa etyl axetat và rượu etylic tuyệt đối và axeton khan trong dung môi hỗn hợp này bằng 1:5:0,8;

(2) Sau đó bổ sung nước tinh khiết vào và đồng thời khuấy hỗn hợp này, và thể tích nước tinh khiết được bổ sung vào gấp 5 lần tổng thể tích của etyl axetat, rượu etylic tuyệt đối, và axeton khan; lưu tốc của nước được bổ sung vào bằng 7ml/phút; và tốc độ khuấy khi bổ sung nước tinh khiết vào bằng 60 vòng/phút;

(3) làm mát đến 12°C với tốc độ 1,2°C/giờ sau khi bổ sung nước tinh khiết vào, và tiếp tục khuấy với tốc độ 15 vòng/phút trong khi làm mát, để thu được hợp chất levoisovalerylspiramyxin I ở dạng tinh thể. Tiến hành đo bằng tia Cu-K α , phổ nhiễu xạ bột tia X phổ của hợp chất levoisovalerylspiramyxin I ở dạng tinh thể là giống Hình 6.

Ví dụ 27: Điều chế levocarimyxin trong đó isovalerylspiramyxin II là hợp chất levoisovalerylspiramyxin II ở dạng tinh thể

Tinh chế levocarimyxin thu được theo Ví dụ 2. Các bước thao tác cụ thể là giống với Ví dụ 22. Điểm khác biệt là mẫu levoisovalerylspiramyxin II này được gom theo thời gian lưu RT 43,34 của levoisovalerylspiramyxin II. Kết tinh lại tiếp bột rắn màu trắng chứa levoisovalerylspiramyxin II để thu được hợp chất ở dạng tinh thể. Phương pháp kết tinh lại như sau:

(1) Đầu tiên, hòa tan hợp chất rắn của levoisovalerylspiramyxin II thu được theo Ví dụ 2 trong dung môi hỗn hợp gồm metanol tuyệt đối, rượu etylic tuyệt đối, và axeton khan với

tỷ lệ thể tích bằng metanol tuyệt đối so với rượu etylic tuyệt đối so với axeton khan trong dung môi hỗn hợp này bằng 1:10:1;

(2) Sau đó bổ sung nước tinh khiết vào và đồng thời khuấy hỗn hợp này, và thể tích nước tinh khiết được bổ sung vào bằng 2,5 lần tổng thể tích của metanol tuyệt đối, rượu etylic tuyệt đối, và axeton khan; lưu tốc của nước được bổ sung vào bằng 4ml/phút; và tốc độ khuấy khi bổ sung nước tinh khiết vào bằng 30 vòng/phút;

(3) làm mát đến 5°C với tốc độ 1°C/giờ sau khi bổ sung nước tinh khiết vào, và tiếp tục khuấy với tốc độ 10 vòng/phút trong khi làm mát, để thu được hợp chất levoisovalerylspiramycin II ở dạng tinh thể. Phổ nhiễu xạ bột tia X của hợp chất levoisovalerylspiramycin II ở dạng tinh thể đo được bằng tia X Cu-K α có các pic đặc trưng với góc 2 θ bằng 10,0°, 11,6°, 16,4°, 17,3°, 19,1°, 21,2°, 22,1°, 22,7°, 26,4°, 26,9°, 27,5°, và 31,5, và phổ nhiễu xạ bột tia X là như được thể hiện trên Hình 7.

Loại bỏ axetonitril của levocarrimycin đã được tinh chế và đã được tách ra khỏi chế phẩm chứa levoisovalerylspiramycin III bằng cách làm bay hơi kiểu quay, sau đó chiết levocarimycin 1 lần bằng etyl axetat, và loại bỏ etyl axetat trong dịch chiết này bằng cách làm bay hơi kiểu quay để thu được mẫu bột nhão; hòa tan lại mẫu bột nhão này trong ete dầu mỏ, và sau đó loại bỏ ete dầu mỏ bằng cách làm bay hơi kiểu quay để thu được levocarimycin; sau đó trộn levocarimycin và hợp chất levoisovalerylspiramycin II ở dạng tinh thể nêu trên để tạo ra levocarimycin trong đó isovalerylspiramycin II là hợp chất levoisovalerylspiramycin II ở dạng tinh thể.

Ví dụ 28: Điều chế levocarimycin trong đó isovalerylspiramycin II là hợp chất levoisovalerylspiramycin II ở dạng tinh thể

Các bước thao tác khác là giống với Ví dụ 27. Điểm khác biệt là bước kết tinh lại, như sau:

(1) Đầu tiên, hòa tan hợp chất rắn của levoisovalerylspiramycin II trong dung môi hỗn hợp gồm metanol tuyệt đối, rượu etylic tuyệt đối, và axeton khan với tỷ lệ thể tích giữa metanol tuyệt đối và rượu etylic tuyệt đối và axeton khan trong dung môi hỗn hợp này bằng 1:10:0,8;

(2) Sau đó bổ sung nước tinh khiết vào và đồng thời khuấy hỗn hợp này. Thể tích nước tinh khiết được bổ sung vào bằng 9 lần tổng thể tích của metanol tuyệt đối, rượu etylic

tuyệt đối, và axeton khan; lưu tốc của nước được bổ sung vào bằng 10ml/phút; và tốc độ khuấy khi bổ sung nước tinh khiết vào bằng 60 vòng/phút;

(3) Làm mát đến 15°C với tốc độ 3°C/giờ sau khi bổ sung nước tinh khiết vào, và tiếp tục khuấy với tốc độ 10 vòng/phút trong khi làm mát, để thu được hợp chất levoisovalerylspiramycin II ở dạng tinh thể. Tiến hành đo bằng tia Cu-K α , phổ nhiễu xạ bột tia X phổ của hợp chất levoisovalerylspiramycin II ở dạng tinh thể là giống Hình 7.

Ví dụ 29: Điều chế levocarimycin trong đó isovalerylspiramycin II là hợp chất levoisovalerylspiramycin II ở dạng tinh thể

Các bước thao tác khác là giống với Ví dụ 27. Điểm khác biệt là bước kết tinh lại, như sau:

(1) Đầu tiên, hòa tan hợp chất rắn của levoisovalerylspiramycin II trong dung môi hỗn hợp gồm metanol tuyệt đối, rượu etylic tuyệt đối, và axeton khan với tỷ lệ thể tích giữa metanol tuyệt đối và rượu etylic tuyệt đối và axeton khan trong dung môi hỗn hợp này bằng 1:5:1;

(2) Sau đó bổ sung nước tinh khiết vào và khuấy hỗn hợp này cùng một lúc. Thể tích nước tinh khiết được bổ sung vào gấp 7,5 lần tổng thể tích của metanol tuyệt đối, rượu etylic tuyệt đối, và axeton khan; lưu tốc của nước được bổ sung vào bằng 6ml/phút; và tốc độ khuấy khi bổ sung nước tinh khiết vào bằng 40 vòng/phút;

(3) Làm mát đến 10°C với tốc độ 2°C/giờ sau khi bổ sung nước tinh khiết vào, và tiếp tục khuấy với tốc độ 15 vòng/phút trong khi làm mát, để thu được hợp chất levoisovalerylspiramycin II ở dạng tinh thể. Tiến hành đo bằng tia Cu-K α , phổ nhiễu xạ bột tia X phổ của hợp chất levoisovalerylspiramycin II dạng tinh thể là giống Hình 7.

Ví dụ 30: Điều chế levocarimycin trong đó isovalerylspiramycin II là hợp chất levoisovalerylspiramycin II dạng tinh thể

Các bước thao tác khác là giống với Ví dụ 27. Điểm khác biệt là bước kết tinh lại, như sau:

(1) Đầu tiên, hòa tan hợp chất rắn của levoisovalerylspiramycin II trong dung môi hỗn hợp gồm metanol tuyệt đối, rượu etylic tuyệt đối, và axeton khan với tỷ lệ thể tích giữa metanol tuyệt đối và rượu etylic tuyệt đối và axeton khan trong dung môi hỗn hợp này bằng 1:3:1;

(2) Sau đó bổ sung nước tinh khiết vào và khuấy hỗn hợp này cùng một lúc. Thể tích nước tinh khiết được bổ sung vào gấp 7,5 lần tổng thể tích của metanol tuyệt đối, rượu etylic tuyệt đối, và axeton khan; lưu tốc của nước được bổ sung vào bằng 8ml/phút; và tốc độ khuấy khi bổ sung nước tinh khiết vào bằng 45 vòng/phút;

(3) Làm mát đến 12°C với tốc độ 2,5°C/giờ sau khi bổ sung nước tinh khiết vào, và tiếp tục khuấy với tốc độ 20 vòng/phút trong khi làm mát, để thu được hợp chất levoisovalerylspiramycin II ở dạng tinh thể. Tiến hành đo bằng tia Cu-K α , phổ nhiễu xạ bột tia X phổ của hợp chất levoisovalerylspiramycin II ở dạng tinh thể là giống Hình 7.

Ví dụ 31: Điều chế levocarimycin trong đó isovalerylspiramycin II là hợp chất levoisovalerylspiramycin II ở dạng tinh thể

Các bước thao tác khác là giống với Ví dụ 27. Điểm khác biệt là bước kết tinh lại, như sau:

(1) Đầu tiên, hòa tan hợp chất levoisovalerylspiramycin II rắn trong dung môi hỗn hợp gồm metanol tuyệt đối, rượu etylic tuyệt đối, và axeton khan với tỷ lệ thể tích giữa metanol tuyệt đối và rượu etylic tuyệt đối và axeton khan trong dung môi hỗn hợp này bằng 1:6:0,8;

(2) Sau đó bổ sung nước tinh khiết vào và khuấy hỗn hợp này cùng một lúc. Thể tích nước tinh khiết được bổ sung vào gấp 5 lần tổng thể tích của metanol tuyệt đối, rượu etylic tuyệt đối, và axeton khan; tốc độ bổ sung nước vào bằng 7ml/phút; và tốc độ khuấy khi bổ sung nước tinh khiết vào bằng 60 vòng/phút;

(3) Làm mát đến 12°C với tốc độ 1,2°C/giờ sau khi bổ sung nước tinh khiết vào, và tiếp tục khuấy với tốc độ 15 vòng/phút trong khi làm mát, để thu được hợp chất levoisovalerylspiramycin II ở dạng tinh thể. Tiến hành đo bằng tia Cu-K α , phổ nhiễu xạ bột tia X phổ của hợp chất levoisovalerylspiramycin II ở dạng tinh thể là giống Hình 7.

Ví dụ 32: Điều chế levocarimycin trong đó isovalerylspiramycin III là hợp chất levoisovalerylspiramycin III ở dạng tinh thể

Tinh chế levocarimycin theo Ví dụ 3. Các bước thao tác cụ thể là giống với Ví dụ 22. Gôm mẫu levoisovalerylspiramycin III theo thời gian lưu bằng 48,009 của levoisovalerylspiramycin III.

Kết tinh lại tiếp bột chứa levoisovalerylspiramycin III rắn màu trắng để thu được

hợp chất này ở dạng tinh thể. Phương pháp kết tinh lại như sau:

- (1) Đầu tiên, hòa tan hợp chất levoisovalerylspiramyxin III ở dạng rắn thu được theo Ví dụ 3 trong dung môi hỗn hợp gồm metanol tuyệt đối, rượu etylic tuyệt đối, và axeton khan với tỷ lệ thể tích giữa metanol tuyệt đối và rượu etylic tuyệt đối và axeton khan trong dung môi hỗn hợp này bằng 1:10:1;
- (2) Sau đó bổ sung nước tinh khiết vào và đồng thời khuấy hỗn hợp này, và thể tích nước tinh khiết được bổ sung vào bằng 2,5 lần tổng thể tích của metanol tuyệt đối, rượu etylic tuyệt đối, và axeton khan; lưu tốc của nước được bổ sung vào bằng 4ml/phút; và tốc độ khuấy khi bổ sung nước tinh khiết vào bằng 30 vòng/phút;
- (3) Làm mát đến 5°C với tốc độ 1°C/giờ sau khi bổ sung nước tinh khiết vào, và tiếp tục khuấy với tốc độ 10 vòng/phút trong khi làm mát, để thu được hợp chất levoisovalerylspiramyxin III ở dạng tinh thể.

Phổ nhiễu xạ bột tia X của hợp chất levoisovalerylspiramyxin III ở dạng tinh thể đo được bằng tia X Cu-K α có các pic đặc trưng với góc 2 θ bằng 8,0°, 10,0°, 11,2°, 11,7°, 16,4°, 19,1°, 19,6°, 20,0°, 21,4°, 22,9°, 23,6°, và 29,4°, và phổ nhiễu xạ bột tia X là như được thể hiện trên Hình 8.

Làm bay hơi axetonitril của levocarimyxin được tinh chế và đã được tách ra khỏi chế phẩm chứa hợp chất levoisovalerylspiramyxin III bằng cách làm bay hơi kiểu quay, sau đó chiết levocarimyxin 1 lần bằng etyl axetat, và làm bay hơi etyl axetat bằng cách làm bay hơi kiểu quay để thu được mẫu bột nhão; hòa tan lại mẫu bột nhão này trong ete dầu mỏ, và sau đó làm bay hơi ete dầu mỏ bằng cách làm bay hơi kiểu quay để thu được levocarimyxin; sau đó trộn levocarimyxin và hợp chất levoisovalerylspiramyxin III ở dạng tinh thể nêu trên để thu được levocarimyxin trong đó isovalerylspiramyxin III là hợp chất levoisovalerylspiramyxin III ở dạng tinh thể.

Ví dụ 33: Điều chế levocarimyxin trong đó isovalerylspiramyxin III là hợp chất levoisovalerylspiramyxin III ở dạng tinh thể

Các bước thao tác khác là giống với Ví dụ 32. Điểm khác biệt là bước kết tinh lại, như sau:

- (1) Đầu tiên, hòa tan hợp chất rắn của levoisovalerylspiramyxin III trong dung môi hỗn hợp gồm metanol tuyệt đối, rượu etylic tuyệt đối, và axeton khan với tỷ lệ thể tích giữa

metanol tuyệt đối và rượu etylic tuyệt đối và axeton khan trong dung môi hỗn hợp này bằng 1:10:1;

(2) Sau đó bổ sung nước tinh khiết với khuấy. Thể tích nước tinh khiết được bổ sung vào bằng 9 lần tổng thể tích của metanol tuyệt đối, rượu etylic tuyệt đối, và axeton khan; lưu tốc của nước được bổ sung vào bằng 10ml/phút; và tốc độ khuấy khi bổ sung nước tinh khiết vào bằng 60 vòng/phút;

(3) Làm mát đến 15°C với tốc độ 3°C/giờ sau khi bổ sung nước tinh khiết vào, và tiếp tục khuấy với tốc độ 10 vòng/phút trong khi làm mát, để thu được hợp chất levoisovalerylspiramycin III ở dạng tinh thể. Tiến hành đo bằng tia Cu-K α , phổ nhiễu xạ bột tia X phổ của hợp chất levoisovalerylspiramycin III ở dạng tinh thể là giống Hình 8.

Ví dụ 34: Điều chế levocarimycin trong đó isovalerylspiramycin III là hợp chất levoisovalerylspiramycin III ở dạng tinh thể

Các bước thao tác khác là giống với Ví dụ 32. Điểm khác biệt về cách kết tinh lại là như sau:

(1) Hòa tan hợp chất levoisovalerylspiramycin III ở trạng thái rắn vào dung môi hỗn hợp gồm metanol tuyệt đối, rượu etylic tuyệt đối và axeton khan, và tỷ lệ thể tích giữa metanol tuyệt đối và rượu etylic tuyệt đối và axeton khan trong dung môi hỗn hợp này bằng 1:5:0,8;

(2) Bổ sung nước tinh khiết trong khi khuấy và thể tích của được bổ sung nước tinh khiết vào gấp 7,5 lần tổng thể tích của metanol tuyệt đối, rượu etylic tuyệt đối và axeton khan; nước tinh khiết được bổ sung vào với tốc độ bằng 6ml/phút; tốc độ khuấy để bổ sung nước tinh khiết vào bằng 40 vòng/phút;

(3) Làm mát hỗn hợp này đến 10°C với tốc độ bằng 2°C/giờ sau khi bổ sung nước tinh khiết vào, và tiếp tục khuấy trong khi làm mát với tốc độ bằng 15 vòng/phút; thu được hợp chất levoisovalerylspiramycin III ở dạng tinh thể.

Phổ nhiễu xạ bột tia X của hợp chất levoisovalerylspiramycin III ở dạng tinh thể đo được bằng tia Cu-K α là tương tự như Hình 8.

Ví dụ 35: Điều chế levocarimycin trong đó isovalerylspiramycin III là hợp chất levoisovalerylspiramycin III ở dạng tinh thể

Các bước thao tác khác là giống với Ví dụ 32, và điểm khác biệt của cách của kết tinh lại là như sau:

(1) Hòa tan hợp chất levoisovalerylspiramycin III ở trạng thái rắn vào dung môi hỗn hợp gồm metanol tuyệt đối, rượu etylic tuyệt đối và axeton khan, và tỷ lệ thể tích giữa metanol tuyệt đối và rượu etylic tuyệt đối và axeton khan trong dung môi hỗn hợp này bằng 1:2:1;

(2) Bổ sung nước tinh khiết trong khi khuấy và thể tích của được bổ sung nước tinh khiết vào gấp 7,5 lần tổng thể tích của metanol tuyệt đối, rượu etylic tuyệt đối và axeton khan; nước tinh khiết được bổ sung vào với tốc độ bằng 8ml/phút; tốc độ khuấy để bổ sung nước tinh khiết vào bằng 45 vòng/phút;

(3) Làm mát hỗn hợp này đến 12°C với tốc độ bằng 2,5°C/giờ sau khi bổ sung nước tinh khiết vào trong khi khuấy với tốc độ bằng 20 vòng/phút, để thu được hợp chất levoisovalerylspiramycin III ở dạng tinh thể.

Phổ nhiễu xạ bột tia X của hợp chất levoisovalerylspiramycin III ở dạng tinh thể đo được bằng tia Cu-K α là tương tự như Hình 8.

Ví dụ 36: Điều chế levocarimycin trong đó isovalerylspiramycin III là hợp chất levoisovalerylspiramycin III ở dạng tinh thể

Các bước thao tác khác là giống với Ví dụ 32, và điểm khác biệt của cách của kết tinh lại là như sau:

(1) Hòa tan hợp chất levoisovalerylspiramycin III ở trạng thái rắn vào dung môi hỗn hợp gồm metanol tuyệt đối, rượu etylic tuyệt đối và axeton khan, và tỷ lệ thể tích giữa metanol tuyệt đối và rượu etylic tuyệt đối và axeton khan của dung môi hỗn hợp này bằng 1:5:0,8;

(2) Bổ sung nước tinh khiết trong khi khuấy và thể tích của được bổ sung nước tinh khiết vào gấp 5 lần tổng thể tích của metanol tuyệt đối, rượu etylic tuyệt đối và axeton khan; nước tinh khiết được bổ sung vào với tốc độ bằng 7ml/phút; tốc độ khuấy để bổ sung nước tinh khiết vào bằng 60 vòng/phút;

(3) làm mát hỗn hợp này đến 12°C với tốc độ bằng 1,2°C/giờ sau khi bổ sung nước tinh khiết vào, trong khi khuấy với tốc độ bằng 15 vòng/phút, thu được hợp chất levoisovalerylspiramycin III ở dạng tinh thể.

Phổ nhiễu xạ bột tia X của hợp chất levoisovalerylspiramyxin III ở dạng tinh thể đo được bằng tia Cu-K α là tương tự như Hình 8.

Ví dụ 37: Viên nén levocarimyxin chứa hợp chất levoisovalerylspiramyxin I ở dạng tinh thể

Công thức và phương pháp điều chế là giống với Ví dụ 12. Điểm khác biệt là bột levocarimyxin là bột levocarimyxin thu được theo Ví dụ 22, trong đó isovalerylspiramyxin I là hợp chất levoisovalerylspiramyxin I ở dạng tinh thể.

Ví dụ 38: Viên nén levocarimyxin chứa hợp chất levoisovalerylspiramyxin I ở dạng tinh thể I

Công thức và phương pháp điều chế là giống với Ví dụ 12. Điểm khác biệt là bột levocarimyxin là bột levocarimyxin thu được theo Ví dụ 27, trong đó isovalerylspiramyxin II là hợp chất levoisovalerylspiramyxin II ở dạng tinh thể.

Ví dụ 39: Viên nén levocarimyxin chứa hợp chất levoisovalerylspiramyxin III ở dạng tinh thể

Công thức và phương pháp điều chế là giống với Ví dụ 12. Điểm khác biệt là bột levocarimyxin là bột levocarimyxin thu được theo Ví dụ 32, trong đó sovalerylspiramyxin IIII là hợp chất levoisovalerylspiramyxin III ở dạng tinh thể.

Ví dụ 40: Viên nang levocarimyxin chứa hợp chất levoisovalerylspiramyxin I ở dạng tinh thể

Công thức và phương pháp điều chế là giống với Ví dụ 13, khác biệt ở chỗ bột levocarimyxin là bột levocarimyxin thu được theo Ví dụ 23, trong đó isovalerylspiramyxin I là hợp chất levoisovalerylspiramyxin I ở dạng tinh thể.

Ví dụ 41: Viên nang levocarimyxin chứa hợp chất levoisovalerylspiramyxin I ở dạng tinh thể I

Công thức và phương pháp điều chế là giống với Ví dụ 13. Điểm khác biệt là bột levocarimyxin là bột levocarimyxin thu được theo Ví dụ 28, trong đó isovalerylspiramyxin II là hợp chất levoisovalerylspiramyxin II ở dạng tinh thể.

Ví dụ 42: Viên nang levocarimyxin chứa hợp chất levoisovalerylspiramyxin III ở dạng tinh thể

Công thức và phương pháp điều chế là giống với Ví dụ 13. Điểm khác biệt là bột levocarimyxin là bột levocarimyxin thu được theo Ví dụ 33, trong đó isovalerylspiramycin III là hợp chất levoisovalerylspiramycin III ở dạng tinh thể.

Tá dược và phương pháp điều chế được sử dụng cho các chế phẩm khác chứa levocarimyxin, trong đó isovalerylspiramycin I, II hoặc III là hợp chất levoisovalerylspiramycin I, II hoặc III ở dạng tinh thể, là giống như trên.

Ví dụ thử nghiệm 1: Dược lực học *in vivo*

Phương pháp thử nghiệm: chuẩn bị dung dịch vi khuẩn gây nhiễm: chuyển các dung dịch vi khuẩn được bảo quản trong tủ lạnh ở nhiệt độ -80°C vào phòng trong thời gian khoảng 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng, và lần lượt hút 0,1ml dung dịch vi khuẩn của *Streptococcus pneumonia*, *Streptococcus pyogenes* và *Enterococcus* cho vào 2ml dịch MH (bổ sung 10% huyết thanh ngựa đã làm bất hoạt); cấy 2ml dịch MH với 0,1ml dung dịch vi khuẩn của *Staphylococcus aureus* theo phương pháp nêu trên, cho dung dịch này vào tủ ấp ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 18 giờ để thu được dung dịch vi khuẩn gốc, pha loãng dung dịch vi khuẩn gốc này bằng dịch nhầy 5% của dạ dày, lấy 100% lượng vi khuẩn gây chết nếu các con chuột bị nhiễm bằng dung dịch vi khuẩn gây nhiễm.

Việc dùng qua đường miệng được dự tính cho các chế phẩm chứa levocarimyxin trên lâm sàng, do vậy việc dùng trong dạ dày được chọn để thử nghiệm levocarimyxin. Sau khi tiêm trong màng bụng lượng 0,5ml vi khuẩn gây chết vào khoang bụng của chuột nhắt, chuột nhắt có các triệu chứng sau như giảm hoạt động, nghỉ ngơi, rụng lông, và v.v. Việc tiến hành thụt bằng 0,2ml cho mỗi con chuột nhắt sau khi nhiễm khuẩn từ 0,5 giờ đến 6 giờ, không có phản ứng bất lợi. Quan sát sự sống của các con chuột này trong bảy ngày và tính liều lượng bảo vệ 50% (ED_{50}) của thuốc ở các con chuột bị nhiễm và so sánh tác dụng bảo vệ của thuốc theo phương pháp Bliss.

Kết quả thử nghiệm *in vivo* được thể hiện trong Bảng 3 và 4

Bảng 3. So sánh tác dụng chữa bệnh của bốn loại thuốc kháng sinh với chuột nhắt được làm nhiễm 6 chủng *Streptococcus* trong khoang bụng

Vi khuẩn thử nghiệm	Liều thử nghiệm (CFU/0,5ml/con chuột)	Thuốc	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	ED_{50} (mg/kg)
---------------------	---------------------------------------	-------	--------------------------	--------------------------

<i>Streptococcus pneumonia</i> ₃	6,4x10 ⁴	Carimyxin	0,12	10,41
		Isovaleryl I là hợp chất ở dạng tinh thể	0,12	8,99
		Isovaleryl II là hợp chất ở dạng tinh thể	0,12	8,39
		Isovaleryl III là hợp chất ở dạng tinh thể	0,12	8,99
		Azithromyxin	0,5	18,29
		Axetyl spiramycin	0,5	66,96
		Erythroxin	1	85,08
<i>Streptococcus pneumonia</i> ₁₈	9,6x10 ⁴	Carimyxin	0,03	10,06
		Isovaleryl I là hợp chất ở dạng tinh thể	0,03	9,94
		Isovaleryl II là hợp chất ở dạng tinh thể	0,03	9,08
		Isovaleryl III là hợp chất ở dạng tinh thể	0,03	8,98
		Azithromyxin	0,06	14,87
		Axetyl spiramycin	0,06	37,93
		Erythroxin	0,06	57,08
<i>Streptococcus pneumonia</i> ₅₇	8,8x10 ⁴	Carimyxin	0,12	16,02
		Isovaleryl I là hợp chất ở dạng tinh thể	0,06	13,60
		Isovaleryl II là hợp chất ở dạng tinh thể	0,06	13,86
		Isovaleryl III là hợp chất ở dạng tinh thể	0,06	12,81
		Azithromyxin	0,25	19,66
		Axetyl spiramycin	1	398,01
		Erythroxin	0,25	102,33
<i>Streptococcus pyogenes</i> ₇₇₂	6,9x10 ³	Carimyxin	0,12	26,30
		Isovaleryl I là hợp chất ở dạng tinh thể	0,06	26,15
		Isovaleryl II là hợp chất ở dạng tinh thể	0,06	23,37
		Isovaleryl III là hợp chất ở dạng tinh thể	0,06	23,37
		Azithromyxin	0,25	46,89
		Axetyl spiramycin	0,25	98,11
		Erythroxin	0,5	101,33
<i>Streptococcus pyogenes</i> ₁₀₂	7,8x10 ⁴	Carimyxin	0,25	87,84
		Isovaleryl I là hợp chất ở dạng tinh thể	0,12	69,67
		Isovaleryl II là hợp chất ở dạng tinh thể	0,12	64,10
		Isovaleryl III là hợp chất ở dạng tinh thể	0,12	64,10
		Azithromyxin	0,5	159,06
		Axetyl spiramycin	0,5	227,07
		Erythroxin	0,5	361,01

<i>Streptococcus pyogenes</i> 119	4,9x10 ⁴	Carimyxin	0,25	68,48
		Isovaleryl I là hợp chất ở dạng tinh thể	0,12	61,87
		Isovaleryl II là hợp chất ở dạng tinh thể	0,12	59,91
		Isovaleryl III là hợp chất ở dạng tinh thể	0,12	59,91
		Azithromyxin	0,5	98,98
		Axetyl spiramycin	0,5	117,53
		Erythroxin	0,5	233,72

Bảng 4 So sánh tác dụng chữa bệnh của 4 thuốc kháng sinh trên chuột nhắt bị nhiễm *Enterococcus* và *Staphylococcus aureus* trong khoang bụng

Vi khuẩn thử nghiệm	Liều thử nghiệm (CFU/0,5ml/con chuột)	Thuốc	MIC (µg/ml)	ED ₅₀ (mg/kg)
<i>Enterococcus</i> 32	5,4x10 ⁴	Carimyxin	0,5	89,29
		Isovaleryl I là hợp chất ở dạng tinh thể	0,5	85,15
		Isovaleryl II là hợp chất ở dạng tinh thể	0,25	68,54
		Isovaleryl III là hợp chất ở dạng tinh thể	0,25	68,54
		Azithromyxin	1	146,51
		Axetyl spiramycin	1	130,34
		Erythroxin	2	175,23
<i>Staphylococcus aureus</i> 16	5,2x10 ³	Carimyxin	0,5	31,98
		Isovaleryl I là hợp chất ở dạng tinh thể	0,5	25,97
		Isovaleryl II là hợp chất ở dạng tinh thể	0,25	26,02
		Isovaleryl III là hợp chất ở dạng tinh thể	0,25	26,02
		Azithromyxin	1	75,80
		Axetyl spiramycin	1	43,58
		Erythroxin	1	82,36
<i>Staphylococcus aureus</i> 76	5,8x10 ⁴	Carimyxin	0,5	31,50
		Isovaleryl I là hợp chất ở dạng tinh thể	0,5	26,50
		Isovaleryl II là hợp chất ở dạng tinh thể	0,25	25,16
		Isovaleryl III là hợp chất ở dạng tinh thể	0,25	25,16
		Azithromyxin	1	58,79
		Axetyl spiramycin	1	66,63
		Erythroxin	1	64,17

<i>Staphylococcus aureus</i> ₁₂	4,8x10 ⁴	Carimyxin	2	120,35
		Isovaleryl I là hợp chất ở dạng tinh thể	1	114,53
		Isovaleryl II là hợp chất ở dạng tinh thể	1	109,59
		Isovaleryl III là hợp chất ở dạng tinh thể	1	109,59
		Azithromyxin	4	217,36
		Axetyl spiramycin	2048	>500
		Erythroxin	256	266,11
<i>Staphylococcus aureus</i> ₂₁	4,2x10 ⁴	Carimyxin	1	59,30
		Isovaleryl I là hợp chất ở dạng tinh thể	0,5	42,67
		Isovaleryl II là hợp chất ở dạng tinh thể	0,5	47,65
		Isovaleryl III là hợp chất ở dạng tinh thể	0,5	47,65
		Azithromyxin	4	142,99
		Axetyl spiramycin	2048	>500
		Erythroxin	4	213,67

Kết quả thử nghiệm *in vivo* cho thấy rằng: tác dụng chữa bệnh của levocarimyxin với chuột nhắt bị nhiễm 12 chủng vi khuẩn như được thể hiện trong Bảng 3 và 4, kết quả cho thấy rằng hợp chất này có tác dụng bảo vệ tốt; và levocarimyxin trong đó isovalerylspiramycin I, II hoặc III là hợp chất levoisovalerylspiramycin I, II hoặc III dạng tinh thể thể hiện tác dụng bảo vệ tốt hơn. Các thử nghiệm tương tự cũng được tiến hành đối với chế phẩm levocarimyxin hoặc levocarimyxin được bào chế theo các ví dụ khác của sáng chế và kết quả là tương tự.

Ví dụ thử nghiệm 2: Dược lực học *in vitro*

I. Xác định các thể phân lập lâm sàng:

Phương pháp thử nghiệm: phương pháp pha loãng gấp đôi aga: rót theo định lượng môi trường aga nóng chảy vào đĩa chứa các nồng độ thuốc theo bậc để trộn với dung dịch thuốc (bổ sung 5% máu dê đã tách tơ huyết vào *Streptococcus* và *Enterococcus* để thu được môi trường máu; bổ sung 7% máu dê đã tách tơ huyết vào *Hemophilus influenza* và bổ sung 7% máu cừu đã tách tơ huyết vào môi trường *Gonococcus* để thu được môi trường sôcôla); sau khi hỗn hợp này hóa rắn, nó được pha loãng đến nồng độ 10⁶CFU/ml bằng dung dịch nuôi cấy vi khuẩn mới, sau đó cuvet aga chứa levocarimyxin thu được từ Ví dụ 4 và nhóm đối chứng gồm azithromycin, axetyl spiramycin và erythroxin được cấy

bằng dụng cụ cấy đa điểm vào đĩa aga chứa chất kháng khuẩn để nuôi cấy trong thời gian 18 giờ ở nhiệt độ 37°C; cho *Gonococcus* vào tủ áp 5% CO₂ để nuôi cấy trong thời gian 24 giờ; cho *Legionella* vào tủ áp 5% CO₂ để nuôi cấy trong thời gian 48 giờ; cho vi khuẩn kỵ khí vào hộp kỵ khí để nuôi cấy trong thời gian 48 giờ ở nhiệt độ 37°C. Quan sát nồng độ tối thiểu của thuốc kháng khuẩn để ức chế sự phát triển của vi khuẩn, tức là nồng độ ức chế tối thiểu (MIC), và tính toán MIC₅₀ và MIC₉₀ của thuốc và so sánh chúng với thuốc đối chứng.

Ghi chú : MIC₅₀ có nghĩa là nồng độ ức chế tối thiểu để ức chế 50% sự phát triển của vi khuẩn; MIC₉₀ có nghĩa là nồng độ ức chế tối thiểu để ức chế 90% sự phát triển của vi khuẩn. Kết quả thử nghiệm được thể hiện trong bảng sau:

Bảng 5. Phân bố các thể phân lập lâm sàng theo độ nhạy bằng carimyxin

Chủng và số chủng	Thuốc	Phạm vi MIC (µg/ml)	MIC ₅₀ (µg/ml)	MIC ₉₀ (µg/ml)
<i>Streptococcus pneumonia</i> (112)	Carimyxin	0,005->64	0,12	4
	Azithromyxin	0,005->64	0,25	8
	Axetyl spiramycin	0,005->64	0,12	>64
	Erythroxin	0,005->64	0,25	64
<i>Streptococcus pyogens</i> (93)	Carimyxin	0,06->64	0,25	64
	Azithromyxin	0,25->64	0,5	>64
	Axetyl spiramycin	0,005->64	0,25	>64
	Erythroxin	0,06->64	0,5	>64
Enterococcus (106)	Carimyxin	0,5->64	2	64
	Azithromyxin	0,25->64	8	>64
	Axetyl spiramycin	0,12->64	4	>64
	Erythroxin	0,5->64	4	>64
<i>Staphylococcus aureus</i> (155)	Carimyxin	0,06->64	2	64
	Azithromyxin	0,5->64	2	>64
	Axetyl spiramycin	0,12->64	64	>64
	Erythroxin	0,12->64	1	>64
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (115)	Carimyxin	0,12->64	2	>64
	Azithromyxin	0,12->64	8	>64
	Axetyl spiramycin	0,03->64	64	>64
	Erythroxin	0,06->64	8	>64
<i>Bacillus influenzae</i> (37)	Carimyxin	0,03-32	0,12	1
	Azithromyxin	0,03->64	0,25	2
	Axetyl spiramycin	0,03->64	0,12	4
	Erythroxin	0,03->64	0,06	32

Gonococcus (10)	Carimyxin	0,12-16	2	8
	Azithromyxin	0,12-64	2	8
	Axetyl spiramycin	0,12-64	4	8
	Erythroxin	0,12-64	1	8

Các thử nghiệm tương tự cũng được tiến hành đối với chế phẩm levocarimyxin hoặc levocarimyxin bào chế được theo các ví dụ khác của sáng chế và kết quả là tương tự.

Ví dụ thử nghiệm 3: Xác định tính kháng *Chlamydia Trachomatis* và *Chlamydia pneumoniae in vitro*

Các phương pháp thử nghiệm:

1. Cây chuyển lần lượt các dòng tế bào HEp-2 và McCoy trong đĩa nuôi cấy 96 lỗ (do Costar Company cung cấp) ở nhiệt độ 37°C và môi trường 5% CO₂ để nuôi cấy trong thời gian 48 giờ, để thu được các tế bào đơn lớp.

2. Pha loãng các chủng cấy đến nồng độ nằm trong khoảng từ 10000 ifu đến 20000 ifu (đơn vị tạo thể vùi)/ml, 0,1ml/lỗ để cấy. Cấy *Chlamydia trachomatis* kiểu huyết thanh B/TW-5/OT và D/UW-3/Cx trên đĩa nuôi cấy tế bào McCoy và *Chlamydia pneumoniae* CWL-029 trên đĩa nuôi cấy tế bào HEp-2. Trước hết, hút dung dịch nuôi cấy tế bào trong đĩa nuôi cấy 96 lỗ, và cấy theo tiêu chuẩn 0,1ml/lỗ. Trong đó, 4 lỗ A11-D11 và 2 lỗ C12 và D12 không được cấy.

3. Sau khi cấy, sử dụng máy ly tâm do Beckman-Coulter Company sản xuất để ly tâm đĩa nuôi cấy tế bào 96 lỗ này với lực ly tâm $\times 1500g$, nhiệt độ ly tâm bằng 35°C và thời gian ly tâm bằng 60 phút.

4. Sau khi ly tâm, hút *Chlamydia trachomatis* hoặc *Chlamydia pneumoniae* đã cấy, và lần lượt bổ sung vào 4 loại thuốc kháng sinh được pha loãng tuần tự, cụ thể là levocarimyxin điều chế được theo Ví dụ 4 của sáng chế; axetylspiramycin, erythroxin và azithromycin làm đối chứng, 0,1ml/lỗ.

5. Nuôi cấy trên đĩa thử nghiệm nhạy thuốc chứa *Chlamydia trachomatis* trong thời gian 48 giờ và đĩa thử nghiệm nhạy thuốc chứa *Chlamydia pneumoniae* trong thời gian 72 giờ trong môi trường có nhiệt độ 37°C và 5% CO₂. Sau khi nuôi cấy, cho hấp thụ dung dịch thuốc kháng sinh, rửa 2 lần bằng PBS (0,01M, độ pH=7,4), và giữ trong 100% rượu metylic trong thời gian 15 phút ở nhiệt độ trong phòng.

6. Nhận diện bằng kỹ thuật nhuộm màu miễn dịch huỳnh quang gián tiếp: lần lượt bổ sung kháng thể đơn dòng *Chlamydia trachomatis* (dòng vô tính N54) và kháng thể đơn dòng *Chlamydia pneumoniae* (dòng vô tính P33) đã tinh chế vào các đĩa thử nghiệm nhạy thuốc chứa *Chlamydia trachomatis* và *Chlamydia pneumoniae*, 50µl/lỗ; ủ trong thời gian 30 phút trong hộp ươm ở nhiệt độ 37°C; sau đó sử dụng thiết bị rửa đĩa để rửa các đĩa này 4 lần, sau đó bổ sung các kháng thể huỳnh quang kháng chuột của thỏ (do Sigma Company cung cấp) vào, 50µl/lỗ; ủ và rửa theo cách tương tự trong cùng điều kiện. Bổ sung glyxerol cố định, 100µl/lỗ; cuối cùng, quan sát kết quả bằng kính hiển vi huỳnh quang đảo ngược Nikon (Diaphot-200).

7. Xác định MIC: MIC được dùng để chỉ nồng độ thuốc kháng sinh được pha loãng tối thiểu có thể triệt tiêu hoàn toàn sự sinh trưởng của thể vùi *Chlamydia trachomatis* hoặc *Chlamydia pneumoniae* trong đĩa thử nghiệm 96 lỗ (Không phát hiện được thể vùi nhuộm màu huỳnh quang trong các lỗ).

Kết quả thử nghiệm là như sau:

Bảng 6. Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) ức chế *in vitro* của bốn thuốc kháng sinh phân tử vòng lớn với *Chlamydia trachomatis* và *Chlamydia pneumoniae*

	Carimycin µg/ml	Axetyl spiramycin (AT-SPM) µg/ml	Erythroxin (EM) µg/ml	Azithromyxin (AM) µg/ml
<i>Chlamydia trachomatis</i> B/TW-5/OT	0,25	4	0,5	0,5
<i>Chlamydia trachomatis</i> D/UW-3/Cx	0,25	2	0,5	0,25
<i>Chlamydia pneumoniae</i> CWL-029	0,016	0,5	≤0,016	0,032

1. Đối với *Chlamydia trachomatis* kiểu huyết thanh B/TW-5/OT, MIC của carimycin bằng 0,25µg/ml, erythroxin và azithromyxin (0,5µg/ml) đứng thứ hai, và axetyl spiramycin (MIC bằng 4 µg/ml) đứng cuối cùng.

2. Đối với *Chlamydia trachomatis* kiểu huyết thanh D/UW-3/Cx, tác dụng *in vitro* của carimycin và azithromyxin là giống nhau, MIC bằng 0,25 µg/ml, là tương đối nhạy; erythroxin (0,5 µg/ml) đứng thứ hai và axetyl spiramycin (MIC bằng 2 µg/ml) đứng cuối

cùng.

3. Đối với *Chlamydia pneumoniae* CWL-029, tác dụng *in vitro* của carimyxin và erythroxin là nhạy nhất, MIC $\leq$ 0,016 μ g/ml, azithromyxin (MIC bằng 0,032 μ g/ml) nhạy hơn; axetyl spiramycin (MIC bằng 0,5 μ g/ml) thì kém.

4. Nói chung, tác dụng của levocarimyxin theo sáng chế đối với *Chlamydia* tốt hơn các thuốc thử nghiệm khác. Các thử nghiệm tương tự cũng được tiến hành đối với chế phẩm levocarimyxin hoặc levocarimyxin được bào chế trong các ví dụ khác của sáng chế, và kết quả là tương tự.

Ví dụ thử nghiệm 4: Xác định hoạt tính kháng *Ureaplasma urealyticum* và *Chlamydia pneumoniae in vitro*

1. Phương pháp thử nghiệm: bổ sung 0,8ml U-PPLO vào mỗi lỗ của đĩa nuôi cấy tế bào loại 12 lỗ vô trùng (bổ sung 0,9ml vào lỗ đối chứng chứa chủng vi sinh vật và 1,0ml vào lỗ đối chứng môi trường).

2. Bổ sung 0,1ml chủng vi sinh vật Uu với mật độ 10⁴CCU/ml vào mỗi lỗ thử nghiệm. Liều lượng cuối cùng trong các lỗ bằng 10³CCU/ml (lỗ đối chứng môi trường sẽ không được bổ sung chủng vi sinh vật).

3. Chia thành 3 nhóm (dung dịch gốc thuốc kháng sinh có nồng độ 100 μ g/ml, 10 μ g/ml và 1 μ g/ml), sử dụng đầu bít vô trùng để bổ sung thuốc kháng sinh thử nghiệm vào mỗi lỗ: 100 μ l, 50 μ l, 25 μ l, 12,5 μ l theo gradien nồng độ suy biến bậc hai. (Không bổ sung thuốc kháng sinh vào lỗ chứa chủng vi sinh vật đối chứng và lỗ chứa môi trường nuôi cấy đối chứng. Đồng thời, bố trí lỗ đối chứng chứa thuốc kháng sinh).

4. Trộn đều tất cả lỗ. Bịt kín đĩa nuôi cấy bằng băng dính và sau đó nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C.

5. Vào thời điểm từ 17 giờ đến 24 giờ sau khi thử nghiệm, quan sát và ghi tình trạng phát triển của Uu. Khi lỗ đối chứng chứa chủng vi sinh vật Uu xuất hiện sự phát triển dương tính, nồng độ thuốc kháng sinh tối thiểu, mà có thể triệt tiêu sự phát triển của Uu, là MIC của mẫu. MIC sau khi thử nghiệm là MIC cuối cùng (24 giờ). Xác định MIC của các chủng *Mycoplasma urealyticum* và *Mycoplasma pneumoniae* 4 lần và kết quả như sau:

carimyxin 0,025-0,125 μ g/ml,

axetyl spiramycin 0,5 μ g/ml,

erythroxin 5 μ g/ml,

azithromycin 0,025-0,125 μ g/ml.

Kết quả trên đây cho thấy carimycin có chức năng kháng Uu mạnh, là giống như chức năng của azithromycin và tốt hơn chức năng của axetyl spiramycin. Chức năng kháng Uu của erythroxin trong thử nghiệm này là kém nhất.

Các thử nghiệm tương tự cũng được tiến hành đối với chế phẩm levocarimycin hoặc levocarimycin được bào chế trong các ví dụ khác của sáng chế và kết quả là tương tự.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất levocarimyxin, trong đó hợp chất levocarimyxin này là hỗn hợp gồm các thành phần chủ yếu là isovalerylspiramycin III, II và I và chứa lượng nhất định isobutyrylspiramycin III và II, butyrylspiramycin III và II, propionylspiramycin III và II, cũng như axetylspiramycin III và II, trong số các hợp chất này hàm lượng của isovalerylspiramycin III không nhỏ hơn 30% trọng lượng, tổng hàm lượng của isovalerylspiramycin III, II và I không nhỏ hơn 60% trọng lượng, và hàm lượng của axylspiramycin nằm trong khoảng từ 80% đến 98% trọng lượng; độ quay quang học riêng của levocarimyxin là $[\alpha]_D = -52^\circ$ đến -57° trong dung dịch clorofom với nồng độ 0,02g/ml ở nhiệt độ bằng 25°C ,

trong đó, isovalerylspiramycin III là hợp chất levoisovalerylspiramycin III ở dạng tinh thể, isovalerylspiramycin II là hợp chất levoisovalerylspiramycin II ở dạng tinh thể hoặc isovalerylspiramycin I là hợp chất levoisovalerylspiramycin I ở dạng tinh thể;

trong đó, hợp chất ở dạng tinh thể của isovalerylspiramycin III được đo bằng phổ nhiễu xạ bột tia X với tia Cu-K- α có các pic đặc trưng với góc 2θ bằng $8,0^\circ$, $10,0^\circ$, $11,2^\circ$, $11,7^\circ$, $16,4^\circ$, $19,1^\circ$, $19,6^\circ$, $20,0^\circ$, $21,4^\circ$, $22,9^\circ$, $23,6^\circ$ và $29,4^\circ$; hợp chất ở dạng tinh thể của isovalerylspiramycin II được đo bằng phổ nhiễu xạ bột tia X với tia Cu-K- α có các pic đặc trưng với góc 2θ bằng $10,0^\circ$, $11,6^\circ$, $16,4^\circ$, $17,3^\circ$, $19,1^\circ$, $21,2^\circ$, $22,1^\circ$, $22,7^\circ$, $26,4^\circ$, $26,9^\circ$, $27,5^\circ$ và $31,5^\circ$; hợp chất ở dạng tinh thể của isovalerylspiramycin I được đo bằng phổ nhiễu xạ bột tia X với tia Cu-K- α có các pic đặc trưng với góc 2θ bằng $7,6^\circ$, $8,0^\circ$, $10,0^\circ$, $11,4^\circ$, $16,4^\circ$, $17,0^\circ$, $17,5^\circ$, $17,9^\circ$, $19,5^\circ$, $22,7^\circ$, $23,7^\circ$ và $24,4^\circ$.

2. Hợp chất levocarimyxin theo điểm 1, trong đó hợp chất levocarimyxin này chứa spiramycin III và các thành phần khác, trong số các hợp chất này, hàm lượng của spiramycin III không lớn hơn 1,0%, và tổng hàm lượng của các thành phần khác nằm trong khoảng từ 2% đến 19% trọng lượng.

3. Hợp chất levocarimyxin theo điểm 2, trong đó nhiệt độ nóng chảy của levocarimyxin này nằm trong khoảng từ 112°C đến 122°C .

4. Hợp chất levocarimyxin theo điểm 3, trong đó nhiệt độ nóng chảy của levocarimyxin này nằm trong khoảng từ 114°C đến 120°C .

5. Hợp chất levocarimyxin theo điểm 2, trong đó tổng hàm lượng của các thành phần khác

nằm trong khoảng từ 2,0% đến 9% trọng lượng.

6. Dược phẩm chứa hợp chất levocarimyxin, trong đó dược phẩm chứa hợp chất levocarimyxin này chứa hợp chất levocarimyxin theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5 gồm các isovalerylspiramycin III, II và I dạng tinh thể theo điểm 1 và chất mang dược dụng.

7. Dược phẩm chứa hợp chất levocarimyxin theo điểm 6, trong đó hàm lượng của levocarimyxin này nằm trong khoảng từ 10% đến 90% trọng lượng.

8. Phương pháp điều chế hợp chất levocarimyxin theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, bao gồm quy trình nuôi cấy, lên men và chiết, trong đó quy trình nuôi cấy và lên men này bao gồm các bước nuôi cấy chủng nấm đã tách dòng WSJ-195 được tạo ra bởi gen 4''-isovaleryl transferaza chứa spiramycin trên môi trường nuôi cấy nghiêng, cấy nó vào môi trường giữ giống, sau đó cấy nó vào môi trường lên men sau khi nuôi cấy, và kiểm soát quy trình lên men này bằng chất điều chỉnh độ pH; khống chế độ pH nằm trong khoảng từ 6,0 đến 9,0; các đường cong thể hiện sự thay đổi của độ pH theo thời gian thể hiện ba pha liên tục, pha thứ nhất thỏa mãn công thức $y_1 = k_1 x_1 + 6,0$, trong đó $0,0227 \leq k_1 \leq 0,1364$, $0 < x_1 \leq 22$; pha thứ hai thỏa mãn $y_2 = k_2 x_2 + b_2$, trong đó $-0,0735 \leq k_2 < 0$, $6,5 < b_2 \leq 10,62$, $22 \leq x_2 \leq 56$; và pha thứ ba thỏa mãn công thức $y_3 = k_3 x_3 + b_3$, trong đó $0 < k_3 \leq 0,0078$, $6,06 \leq b_3 < 6,5$, $56 \leq x_3 \leq 120$; và phương pháp điều chế này còn gồm các bước:

a) tách và tinh chế levocarimyxin để thu được levoisovalerylspiramycin I, II hoặc III;

b) kết tinh lại hợp chất levoisovalerylspiramycin I, II hoặc III để thu được hợp chất levoisovalerylspiramycin I, II hoặc III dạng tinh thể;

c) loại bỏ axetonitril trong levocarimyxin còn lại sau khi tách và tinh chế levoisovalerylspiramycin I, II hoặc III ở bước a) bằng cách làm bay hơi kiểu quay, sau đó chiết một lần với một lượng etyl axetat, và loại bỏ etyl axetat trong dịch chiết này bằng cách làm bay hơi kiểu quay để thu được mẫu bột nhão; hòa tan lại mẫu thu được này bằng ete dầu mỏ, và loại bỏ ete dầu mỏ bằng cách làm bay hơi kiểu quay để thu được levocarimyxin;

d) trộn hợp chất levoisovalerylspiramycin I, II hoặc III dạng tinh thể thu được ở bước b) với levocarimyxin thu được ở bước c) để thu được levocarimyxin, trong đó

isovalerylspiramyxin I, II hoặc III là hợp chất levoisovalerylspiramyxin I, II hoặc III dạng tinh thể;

việc tách và tinh chế trong bước a) là:

tinh chế levocarimyxin thu được trong bước tách sơ bộ theo phương pháp sắc ký lỏng hiệu suất cao điều chế, chuẩn bị cột sắc ký với ODS, sử dụng dung dịch đệm axetonitril và amoni axetat làm pha động trong quá trình rửa giải theo gradient; ghi các ảnh phổ UV riêng biệt bằng cách phát hiện tia cực tím, và gom các pic đích của các thành phần levoisovalerylspiramyxin I, II hoặc III:

cột sắc ký: cột sắc ký điều chế ODS;

pha động: axetonitril (A), dung dịch amoni axetat 100mM (B);

điều kiện gradient: chọn gradient tuyến tính trong thời gian từ 0 đến 60 phút, A nằm trong khoảng từ 25% đến 65%; và khoảng từ 61 phút đến 90 phút, A nằm trong khoảng từ 65% đến 90%;

lưu tốc: 260ml/phút;

thể tích phun: 10ml;

nồng độ lấy mẫu: 0,5g/ml;

bước sóng đo: 231nm;

cách gom: gom bằng cách kích hoạt tia cực tím;

gom mẫu levoisovalerylspiramyxin I theo thời gian lưu bằng 44,759 phút của levoisovalerylspiramyxin I; hoặc gom mẫu isovalerylspiramyxin II theo thời gian lưu bằng 43,34 phút của isovalerylspiramyxin II; hoặc gom mẫu levoisovalerylspiramyxin III theo thời gian lưu 48,009 của levoisovalerylspiramyxin III; sau đó loại bỏ axetonitril bằng cách làm bay hơi kiểu quay, chiết một lần với một lượng etyl axetat, và loại bỏ etyl axetat trong dịch chiết này bằng cách làm bay hơi kiểu quay để thu được mẫu bột nhão; hòa tan lại mẫu thu được này bằng ete dầu mỏ, và loại bỏ ete dầu mỏ bằng cách làm bay hơi kiểu quay để thu được bột rắn màu trắng chứa levoisovalerylspiramyxin I, II hoặc III;

trong đó, hợp chất levoisovalerylspiramyxin I dạng tinh thể thu được theo quy trình kết tinh lại sau đây: hòa tan bột rắn màu trắng chứa levoisovalerylspiramyxin I trong dung môi hỗn hợp gồm metanol tuyệt đối, rượu etylic tuyệt đối và axeton khan, sau đó bổ sung

nước tinh khiết vào trong khi khuấy, sau đó giảm nhiệt độ đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 5°C đến 15°C trong khi khuấy liên tục, để thu được hợp chất levoisovalerylspiramyxin I ở dạng tinh thể, trong đó tỷ lệ thể tích giữa etyl axetat và rượu etylic tuyệt đối và axeton khan trong dung môi hỗn hợp này là 1:0,1 đến 10:0,5 đến 1;

hợp chất levoisovalerylspiramyxin II ở dạng tinh thể thu được theo quy trình kết tinh lại sau đây: hòa tan bột rắn màu trắng chứa levoisovalerylspiramyxin II trong dung môi hỗn hợp gồm metanol tuyệt đối, rượu etylic tuyệt đối và axeton khan, sau đó bổ sung nước tinh khiết vào trong khi khuấy, sau đó giảm nhiệt độ đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 5°C đến 15°C trong khi khuấy liên tục, để thu được hợp chất levoisovalerylspiramyxin II ở dạng tinh thể, trong đó tỷ lệ thể tích giữa metanol tuyệt đối và rượu etylic tuyệt đối và axeton khan trong dung môi hỗn hợp này là 1:0,1 đến 10:0,5 đến 1;

hợp chất levoisovalerylspiramyxin III ở dạng tinh thể thu được theo quy trình kết tinh lại sau đây: hòa tan bột rắn màu trắng chứa levoisovalerylspiramyxin III trong dung môi hỗn hợp gồm metanol tuyệt đối, rượu etylic tuyệt đối và axeton khan, sau đó bổ sung nước tinh khiết vào trong khi khuấy, sau đó giảm nhiệt độ đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 5°C đến 15°C trong khi khuấy liên tục, để thu được hợp chất levoisovalerylspiramyxin III ở dạng tinh thể, trong đó tỷ lệ thể tích giữa metanol tuyệt đối và rượu etylic tuyệt đối và axeton khan trong dung môi hỗn hợp này là 1:0,1 đến 10:0,5 đến 1.

9. Phương pháp điều chế theo điểm 8, trong đó quy trình chiết nêu trên bao gồm các bước: xử lý dịch lên men bằng nhôm sulfat để thu được dịch lọc, điều chỉnh độ pH đến trị số nằm trong khoảng từ 8,5 đến 9,0, chiết bằng butyl axetat, rửa dịch chiết butyl axetat này lần lượt bằng nước không phải nước muối và dung dịch NaH_2PO_4 1%, sau đó chiết bằng nước có độ pH nằm trong khoảng từ 2,0 đến 2,5 để thu được dịch chiết trong nước, điều chỉnh độ pH đến trị số nằm trong khoảng từ 4,5 đến 5,5, làm bay hơi và loại bỏ butyl axetat dư để thu được dịch chiết chứa nước, lọc và điều chỉnh độ pH đến trị số nằm trong khoảng từ 8,5 đến 9,0, thu được chất kết tủa, rửa chất kết tủa này bằng nước tinh khiết và sấy khô nó để thu được levocarimyxin.

10. Phương pháp điều chế theo điểm 8, trong đó việc nuôi cấy trên môi trường nuôi cấy nghiêng kéo dài trong khoảng thời gian từ 8 ngày đến 15 ngày ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 28°C đến 38°C; việc nuôi cấy trong môi trường giữ giống kéo dài trong khoảng thời gian từ 40 giờ đến 80 giờ ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 25°C đến 30°C; và việc lên

men trong môi trường lên men kéo dài trong khoảng thời gian từ 72 giờ đến 120 giờ ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 26°C đến 30°C.

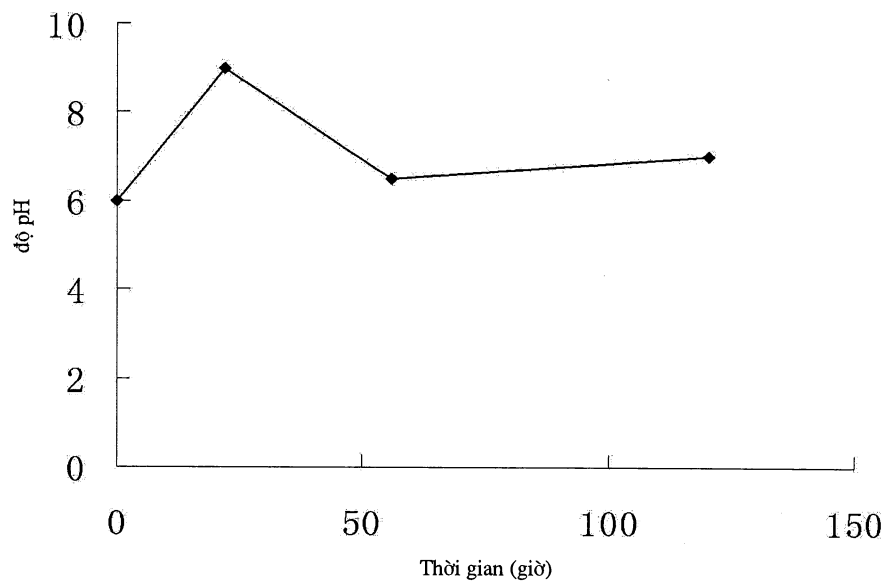
11. Phương pháp điều chế theo điểm 8, trong đó trong quy trình lên men, độ pH được khống chế ở trong khoảng từ 6,0 đến 8,0.

12. Phương pháp điều chế theo điểm 8, trong đó,

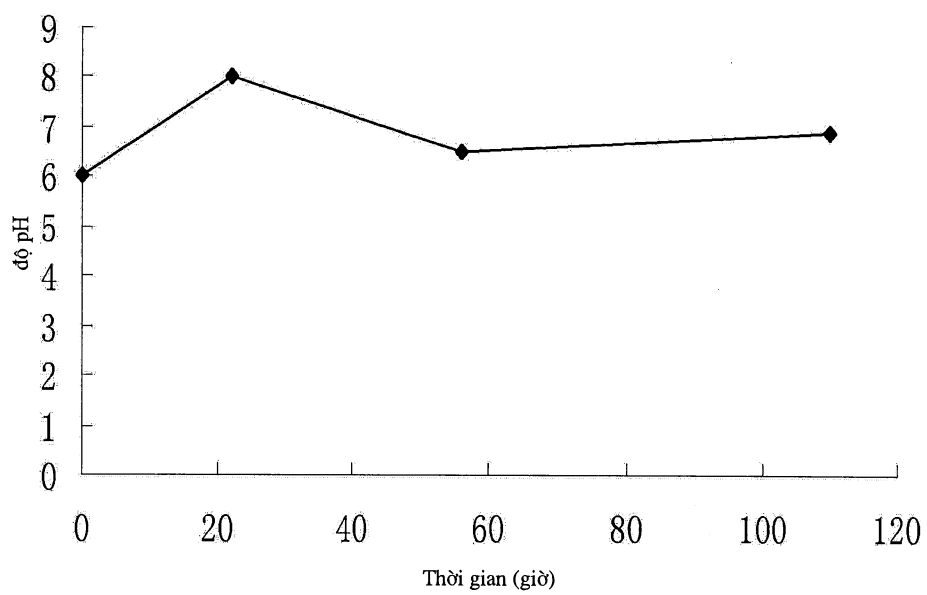
trong quy trình điều chế hợp chất levoisovalerylspiramycin I ở dạng tinh thể, tỷ lệ thể tích giữa etyl axetat và rượu etylic tuyệt đối và axeton khan trong dung môi hỗn hợp này là 1:2 đến 8:0,8 đến 1;

trong quy trình điều chế hợp chất levoisovalerylspiramycin II ở dạng tinh thể, tỷ lệ thể tích giữa metanol tuyệt đối và rượu etylic tuyệt đối và axeton khan trong dung môi hỗn hợp này là 1:2 đến 8:0,8 đến 1;

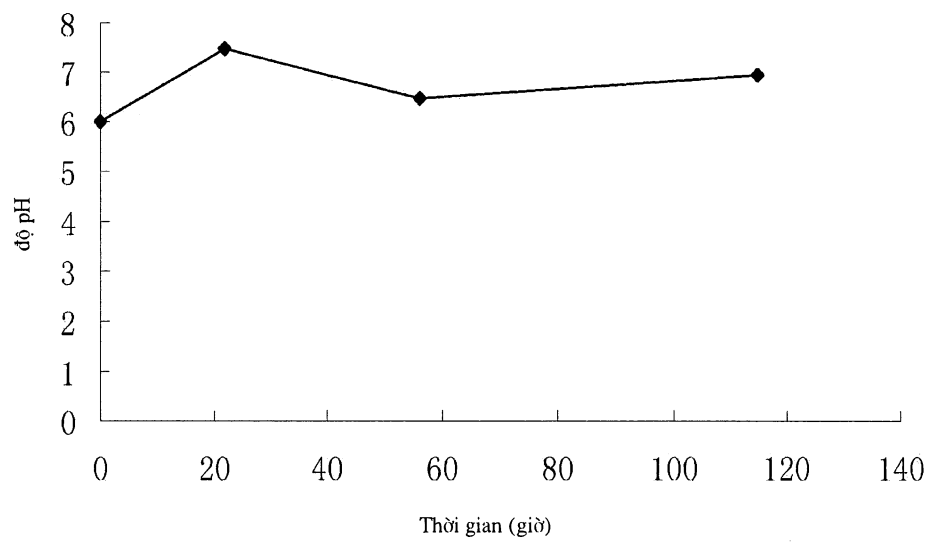
trong quy trình điều chế hợp chất levoisovalerylspiramycin III ở dạng tinh thể, tỷ lệ thể tích giữa metanol tuyệt đối và rượu etylic tuyệt đối và axeton khan trong dung môi hỗn hợp này là 1:2 đến 8:0,8 đến 1.



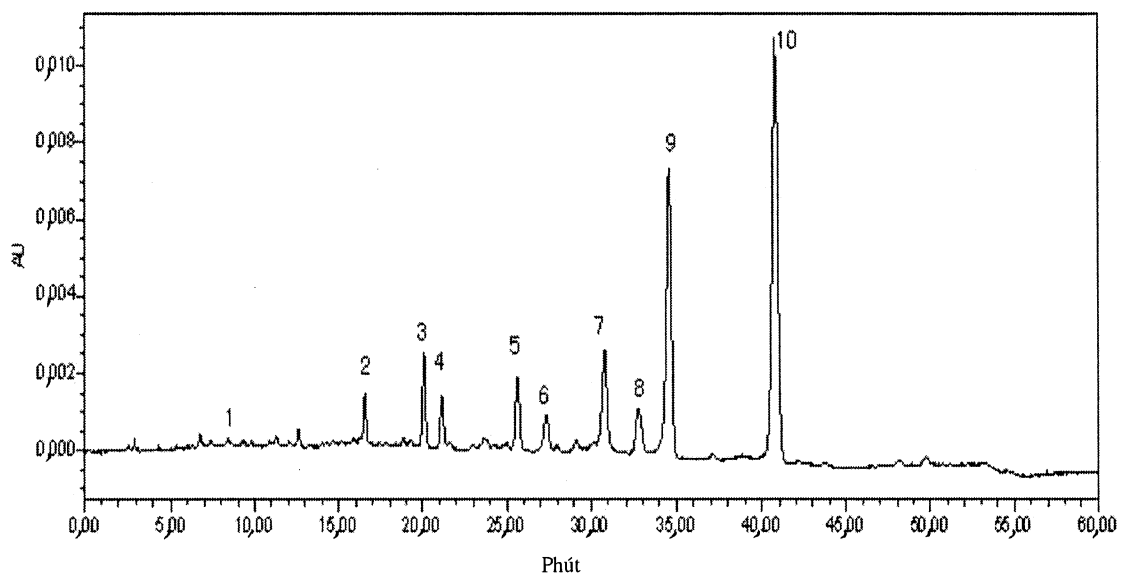
Hình 1



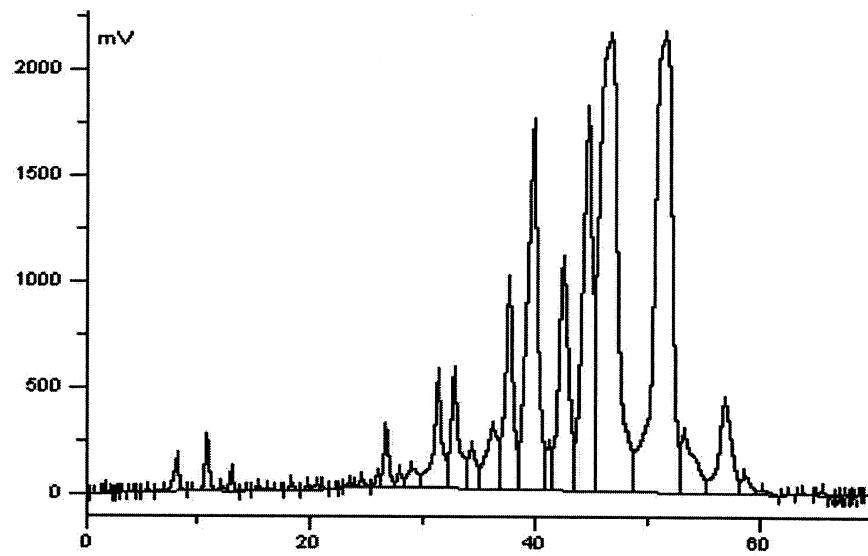
Hình 2



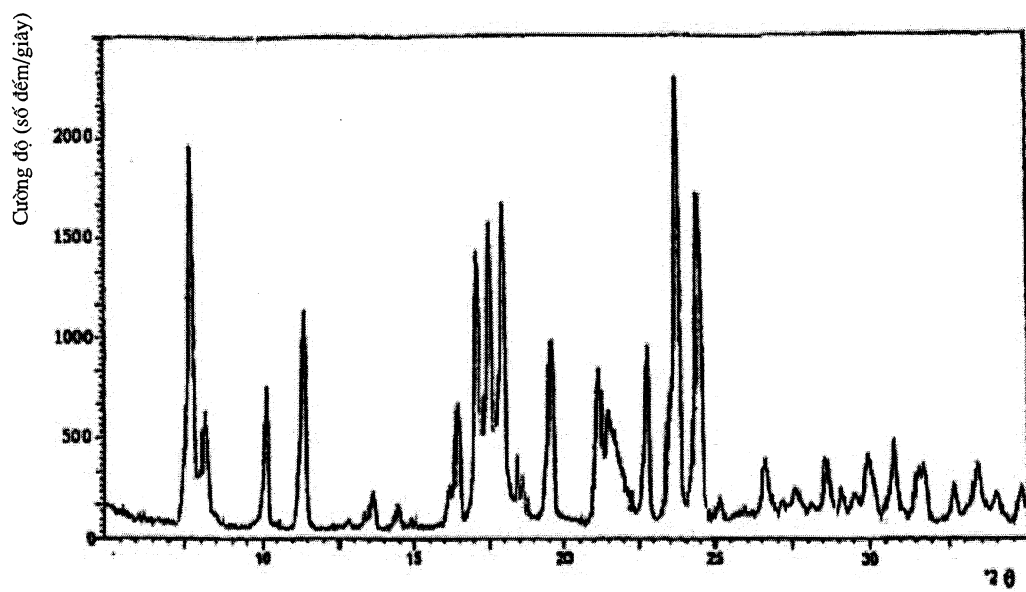
Hình 3



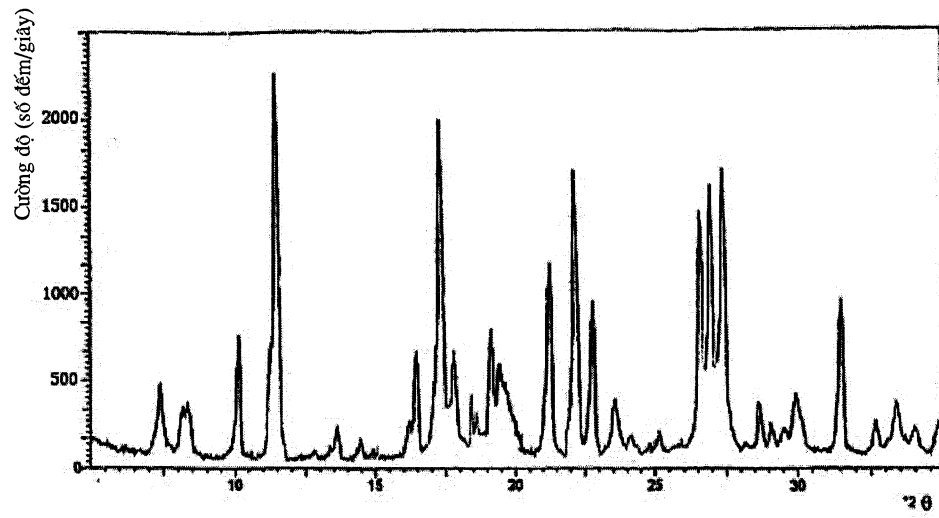
Hình 4



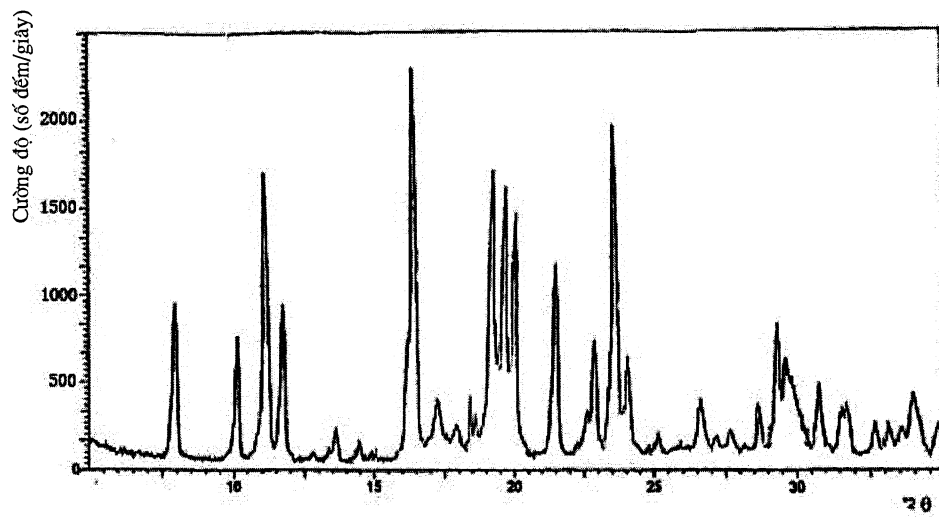
Hình 5



Hình 6



Hình 7



Hình 8